

Wykaz skrótów do rozdziału 9

ACE – konwertaza
AlbSNO – S-nitrozoalbumina
CySNO – S-nitrozocysteina
DAFG – dehydrogenaza aldehydu-3-fosfoglicerynowego
GSH – zredukowany glutation
GSNO – S-nitrozoglutation
 γ -GT – γ -glutamylotranspeptydaza
HbSNO – S-nitrozohemoglobina
NAC – N-acetylocysteina
NOS – syntaza tlenku azotu
NPS – nitroprusydek sodu
NTG – nitrogliceryna
ONOO⁻ – nadtlendioazotyn
PETN – tetraazotan pentaerytrylu
RFA – reaktywne formy azotu
RFT – reaktywne formy tlenu
RS[•] – rodnik tiylowy
SAM – syntetaza S-adenozylometioninowa
SNT – S-nitrozotiole

9. UDZIAŁ TIOLI W BIOLOGICZNEJ ROLI TLENKU AZOTU

Lidia Włodek

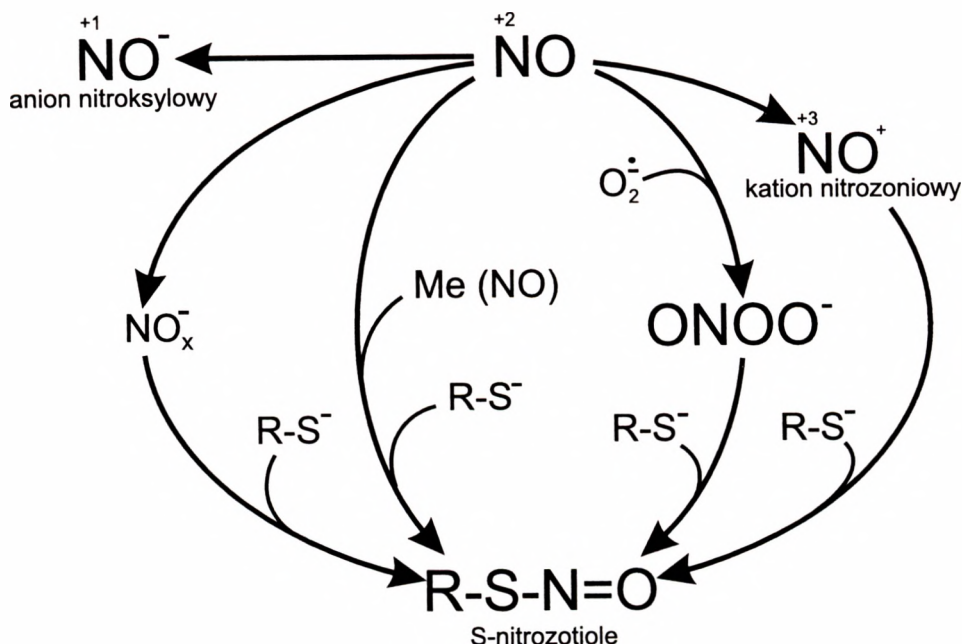
9.1. Powstawanie, biodegradacja i biologiczne właściwości S-nitrozotiole

9.1.1. Wprowadzenie

Tlenek azotu (NO) jest nietrwałym, dwuatomowym rodnikiem, odgrywającym ważną rolę w regulacji i utrzymywaniu homeostazy układu krążenia, centralnego systemu nerwowego i immunologicznego [1, 2, 3]. W komórkach śródbłonna naczyń i w komórkach układu nerwowego NO jest produkowany w niewielkich ilościach przez konstytutywną syntazę tlenku azotu (NOS). Druga izoforma NOS, tzw. indukowalna, została wykryta w komórkach układu immunologicznego, w których NO jest produkowany w większych, nmolowych ilościach, gdzie możliwości toksycznego działania NO są wykorzystywane w reakcjach obronnych organizmu [1]. O biologicznej aktywności tlenku azotu (NO) decyduje nie tylko jego biosynteza, ale także możliwość transportu, magazynowania oraz szybkość i kierunek biodegradacji [4, 5]. Zatem od obecności różnych postaci redoksowych tlenku azotu (NO) (zwanym również reaktywnymi formami azotu – RFA) będzie zależeć fizjologiczne, terapeutyczne, a także patologiczne działanie NO [4]. Poznanie zatem mechanizmów transportu oraz sposobów przechowywania i uwalniania NO jest konieczne zarówno dla poznania biologicznej roli NO, jak i dla ewentualnej farmakologicznej interwencji. W komórkach istnieją różne „pule” NO, których odpowiedni poziom jest determinowany przez potencjał oksydacyjno-redukcyjny, pH, równowagę pro- i antyoksydacyjną oraz możliwości transportu poprzez błonę komórkową (ryc. 1). Takimi najważniejszymi formami redoksoowymi NO są: anion nitroksylowy (NO^-) i kation nitrozonowy (NO^+), tlenki azotu (NO_x), azotany III i azotany V (NO_2^- i NO_3^-), kompleksy nitrozyłowe z metalami przejściowymi ($\text{Me}(\text{NO})$) oraz nadtlenoazotyn (ONOO^-), produkt reakcji NO z anionorodnikiem nadtlenkowym ($\text{O}_2^{\cdot -}$) [4, 6]. Anion ten w warunkach fizjologicznych może ulegać protonacji do kwasu nadtlenoazotowego (HONOO), który rozpada się do silnie utleniających NO_2 i rodnika hydroksylowego $\cdot\text{OH}$.

Każda z reaktywnych form azotu (RFA) w nadmiarze może stać się odpowiedzialna za toksyczność związaną z NO. Dlatego możliwość reakcji RFA z grupami $-\text{SH}$ do S-nitrozotiole ($\text{R}-\text{S}-\text{NO}$) można uważać za reakcje detoksykacji [4, 6] (ryc. 1).

W chwili obecnej poznanie wszystkich aspektów mechanizmu zarówno powstawania, jak i biodegradacji SNT stanowi obiekt intensywnych badań.



Ryc. 1. Powstawanie reaktywnych form azotu (RFA) (wg Stamlera [4] zmodyfikowana)

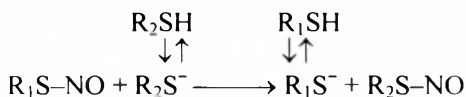
9.1.2. Reakcje powstawania S-nitrozotiole (SNT)

Historia odkrycia S-nitrozotiole (SNT) wiąże się z obserwacjami wskazującymi, że dla zahamowania wzrostu bakterii przez NO_2^- konieczna jest obecność tiole [7]. Następnie Ignarro [8], już na kilka lat przed odkryciem w komórkach ssaków endogennej syntezy NO, zauważył udział grup sulfhydrylowych w bioaktywacji farmakologicznych donorów NO. Jednak największe zainteresowanie interakcją pomiędzy NO i tiołami notuje się od pionierskich badań Stamlera, który po raz pierwszy zwrócił uwagę na powstawanie w biologicznych warunkach SNT [9]. Związki te, jak stwierdzono, powstają w komórkach endogenne i aktualnie stanowią niezwykle interesujący obiekt badań związanych z tlenkiem azotu [10]. Zainteresowanie to skupia się nad powstawaniem i biodegradacją SNT oraz nad biologicznymi właściwościami, jakie wykazują w fizjologicznym pH.

Tlenek azotu (NO) jako rodnik posiada niesparowany elektron i dlatego nie może bezpośrednio reagować z tiołami. Może to nastąpić dopiero po utracie tego elektronu, tj. po utlenieniu do kationu nitrozoniowego NO^+ , co nadaje mu elektrofilność i reaktywność w stosunku do grup hydrosulfidowych [9, 10, 11, 12]. W warunkach beztlenowych reakcja taka jest możliwa w obecności akceptora elektronu, np. NAD^+ zastępującego tlen. Reakcje przebiegające z udziałem NO^+ i jonów tiołanowych są szybkie i odwracalne [11, 12].

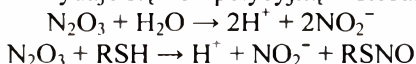


W komórkach SNT wykazują możliwość heterolitycznego rozpadu i transportu NO^+ na inne jony tiolanowe R-S^- , co prowadzi do powstawania kolejnych cząsteczek SNT.



Tego typu reakcje S-transnitrozytacji* należy rozpatrywać jako transfer NO^+ z SNT na kolejny jon tiolanowy (R-S^-) będący akceptorem NO^+ , czyli będzie to proces, w którym SNT zarówno powstają, jak i ulegają biodegradacji [11]. S-transnitrozyłacja ma charakter reakcji łańcuchowej, w której NO^+ jest przekazywany z jednego dawcy na kolejny akceptor, aż do momentu krytycznej, docelowej reakcji S-nitrozyłacji [11, 12]. O możliwości transferu NO^+ na tiole będzie decydować wartość pK grup sulfhydrylowych (co wpływa na stężenie jonów tiolanowych), a więc będzie to zależne od struktury chemicznej cząsteczki tioli [11, 12, 13]. Zatem kluczową rolę w reakcjach S-nitrozyłacji odgrywa kation NO^+ , którego reakcja z anionami tiolanowymi (R-S^-) prowadzi do powstania SNT.

Za czynnik nitrozyłujący uważany jest także N_2O_3 , którego reakcja z tiolami prowadząca do powstania SNT wydaje się kompetycyjną w stosunku do reakcji z wodą:

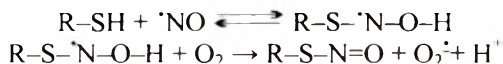


Teoretycznie przy wysokim stężeniu tkankowym GSH (od 0,5 mM do 10 mM) prawie cały N_2O_3 powstający w wyniku utleniania endogennego NO, powinien reagować z GSH [14, 15]. Nie oznacza to jednak, że całość powstającego endogennie NO będzie w postaci N_2O_3 reagować z tiolami [14, 15, 16]. NO może bowiem w komórkach równocześnie reagować nie tylko z tlenem (O_2) do N_2O_3 , ale i z aminami, z tyrozyną, z wolnymi rodnikami (O_2^-) oraz jonami Fe^{+2} i Fe^{+3} hemoprotein i białek siarkowo-żelazowych [12, 13]. Badania kinetyczne wykazują, że reakcja utleniania NO tlenem cząsteczkowym do N_2O_3 (czynnika silnie nitrozyłującego) przebiega wolno, co limituje powstawanie na tej drodze SNT [14, 16]. Dlatego w fizjologicznych warunkach tylko nieznaczna ilość powstającego endogennie NO może być utleniana do N_2O_3 i na tej drodze prowadzić do powstawania SNT. W przypadku glutationu (GSH), którego stężenie w komórkach jest wysokie (5 mM lub wyższe), możliwe jest powstawanie GSNO z udziałem N_2O_3 , jednak przy niższych stężeniach GSH w komórce reakcje te stają się odpowiednio jeszcze mniej znaczące [14, 16]. Również w przypadku białkowych tioli, jak np. albuminy osocza, reakcja N_2O_3 z grupami $-\text{SH}$ tego białka wydaje się nie mieć większego znaczenia [14]. Ponieważ S-nitrozoalbuminy (AlbSNO) ilościowo stanowią dominującą postać SNT w osoczu, oznacza to, że S-nitrozyłacja albumin musi następować poprzez alternatywny mechanizm, taki jak np. reakcje S-transnitrozyłacji.

* Nazwy „S-transnitrozyłacja” i „S-nitrozyłacja” są powszechnie stosowane w literaturze. Ostatnio Hogg [5] zaleca stosowanie pojęć „S-transnitrozacja” (ang. *transnitrosation*) oraz „S-nitrozacja” (ang. *S-nitrosation*).

Na takiej drodze mogłaby również następować wymiana NO pomiędzy wysoko- i niskocząsteczkowymi tiolami [17, 18].

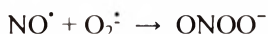
Ostatnio Gow i współpracownicy [19] wskazują na możliwość bezpośredniej reakcji NO z tiolami z powstaniem SNT. Następuje to poprzez przejściowy rodnikowy intermediat ($\text{R-S}^-\text{N-O-H}$), którego reakcja z cząsteczką tlenu (lub innym akceptorem elektronu) prowadzi następnie do powstawania SNT.



Gow [19] sugeruje również alternatywną drogę powstawania SNT w reakcji tioli z rodnikiem nitrozylo-dioksydowym (ONOO^\cdot), charakteryzującym się silnymi właściwościami utleniającymi i nitrozylującymi [20, 21].



W obu tych reakcjach oprócz SNT powstaje dodatkowo anionorodnik ponadtlenkowy ($\text{O}_2^{\cdot-}$), którego reakcja z kolejną cząsteczką NO prowadzi do toksycznego nadtlenoazotynu (ONOO^-) [21, 22].

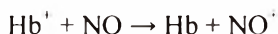


Możliwa jest także nitrozylacja tioli z udziałem nadtlenoazotynu (ONOO^-), jednak powstawanie SNT na tej drodze wydaje się mało znaczące [23].

Innym możliwym mechanizmem powstawania SNT jest nukleofilny atak jonu tiolanowego R-S^- na atom azotu w NO_3^- z utworzeniem tioazotanu (R-S-NO_2), którego izomeryzacja (migracja tlenu od atomu azotu do siarki) prowadzi do powstania sulfonyloazotynu (R-SONO), związku, który reagując z nukleofilnymi tiolami, tworzy SNT [9, 24].

Z badań Inoue i współpracowników [25] wynika, że ceruloplazmina, białko biorące udział w transporcie miedzi, może również w obecności tioli katalizować reakcje jednoelektronowego utleniania NO do NO^+ z powstaniem SNT. Powstawanie S-nitrozotioli jest również możliwe z udziałem kationów Cu^{+2} [26].

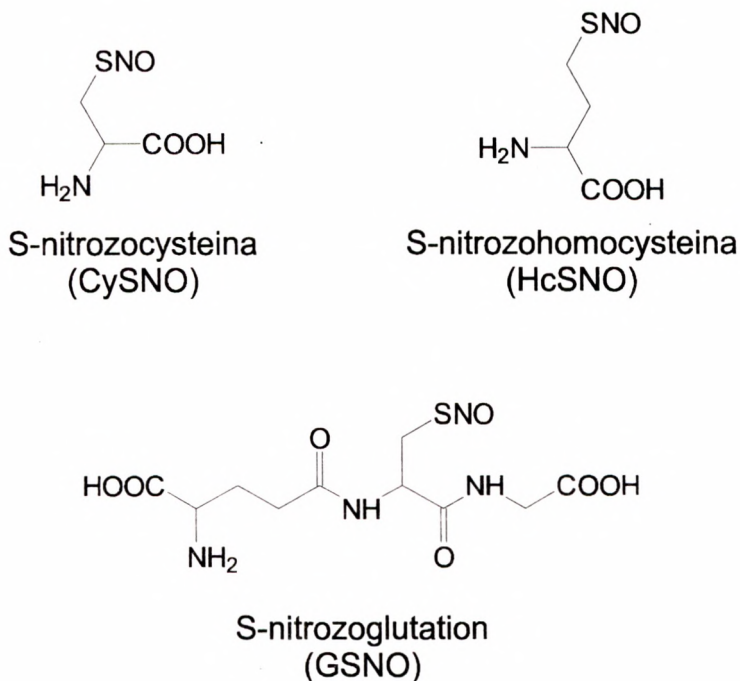
Reakcja tlenu azotu z żelazem hemoprotein prowadzi do nitrozylowych kompleksów będących potencjalnym źródłem kationu nitrozonowego w reakcjach S-nitrozylacji [4, 9, 15]:



Głównym rezerwuarem NO w komórkach (z wyjątkiem osocza i erytrocytów) jest S-nitrozoglutation (GSNO) [9, 11, 13]. W płytkach krwi i w aktywowanych ludzkich neutrofilach, reakcje glutationu (GSH) z reaktywnymi formami NO prowadzą do trwałego GSNO [9, 27]. Reakcja powstawania GSNO jest termodynamicznie i kinetycznie uprzywilejowana ze względu na wysokie stężenie glutationu w komórkach.

Zatem podsumowując, pochodne tlenu azotu (NO_x , ONOO^- i Me(NO)) mogą prowadzić do nitrozylacji nukleofilnych grup $-\text{SH}$ z powstaniem kolejnych reaktywnych form azotu, tj. S-nitrozotioli (SNT) (ryc. 1). Reakcje te uważa się zarówno za mechanizm regulacji komórkowej, jak i za sposób magazynowania i transportu NO [9, 11, 28]. Oznacza to, że w fizjologicznych warunkach tiole reagują nie tylko z reaktywnymi formami tlenu (RFT), ale również z reaktywnymi formami azotu (RFA), dzięki

czemu mogą w obu przypadkach regulować ich biologiczną aktywność. Naturalnie występujące w komórkach niskocząsteczkowe SNT przedstawia ryc. 2.



Ryc. 2. Naturalnie występujące w komórkach niskocząsteczkowe S-nitrozotiole (SNT)

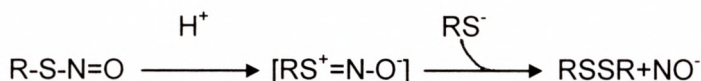
9.1.3. Reakcje biodegradacji S-nitrozotiole (SNT)

Biologiczne właściwości SNT są inne niż samego NO, ponieważ związki te posiadają elektrofilną reaktywność związaną z kationem NO^+ [11]. Od charakteru chemicznego reakcji biodegradacji SNT będzie zatem zależeć mechanizm biologicznego działania tych połączeń. Okazuje się, że po podaniu SNT w dożylniej iniekcji bardzo szybko ustaje ich farmakologiczne działanie na układ naczyniowy [29]. Oznacza to, że w komórkach systemu naczyniowego musi następować szybka biodegradacja SNT lub transport do innych tkanek, gdzie ulegają biodegradacji do biologicznie nieaktywnych związków. Gordge i współpracownicy [30] sugerują, że we wszystkich rodzajach komórek istnieją mechanizmy umożliwiające biotransformację SNT. W związku z tym dokładne poznanie przebiegu biodegradacji SNT jest bardzo istotne, ponieważ związki te powstają endogennie [9, 13], jak również są stosowane jako leki [31, 32]. Uważa się, że bioaktywność SNT w komórkach jest raczej regulowana poprzez biodegradację niż przez biosyntezę. Stabilność SNT zależy od trwałości wiązania pomiędzy siarką i azotem ($-\text{S}-\text{N}=\text{O}$), które może ulegać zarówno homolitycznemu, jak i heterolitycznemu rozbięciu [33]. Oznacza to, że biodegradacja SNT może mieć przebieg zarówno homo-

lityczny, jak i heterolityczny, czyli może prowadzić do uwalniania się: NO, NO⁺ i NO⁻ [9, 33].

9.1.3.1. Heterolityczny rozpad S-nitrozotiosi (SNT) z powstawaniem disiarczków

Występowanie formy rezonansowej SNT umożliwia atak jonu tiolanowego na dodatnio naładowany atom siarki, co prowadzi do heterolitycznego rozpadu do wykazującego relaksacyjne działanie anionu nitroksylowego (NO⁻) oraz do powstawania disulfidu [9, 34].

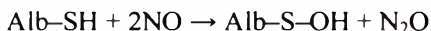


Dalsza reakcja NO⁻ z tiolami może również prowadzić do powstawania disiarczków oraz hydroksylaminy.



Uwalnianie się anionu nitroksylowego (NO⁻) zaobserwowano również w przypadku S-nitrozohemoglobiny [35]. Oznacza to, że SNT z udziałem tioli mogą ulegać redukcji do anionu nitroksylowego z równoczesnym powstawaniem disiarczków [33, 36]. S-nitrozylacja grup sulfhydrylowych (-SH) może być zatem etapem pośrednim na drodze utleniania tioli do disiarczków ze wszystkimi tego konsekwencjami dla struktury i funkcji tych cząsteczek. Byłoby to w swoich skutkach podobne do reakcji tiolacji towarzyszących oksydacyjnym stresom, w których reakcje grup hydrosulfidowych z disulfidami, np. utlenionym glutationem (GSSG), prowadzą do powstawania mieszanych disiarczków [37].

Do powstawania disulfidów (jak to wykazano na przykładzie albuminy) może również dochodzić w reakcji utleniania grup -SH przez NO do kwasów sulfenowych [38, 39].



Silnie elektrofilny charakter atomu siarki w kwasach sulfenowych umożliwia następnie reakcję z tiolami (z cysteiną lub GSH) do mieszanych disiarczków.

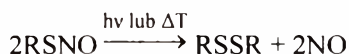


Dłatego utlenianie grup -SH albuminy przez NO, H₂O₂ i ONOO⁻ do kwasów sulfenowych wyjaśnia przynajmniej częściowo towarzyszące temu powstawanie mieszanych disiarczków [39].

Grupy –SH odgrywają niezwykle ważną rolę dla struktury i funkcji białek, a także w biologicznej roli tiolowego tripeptydu glutationu i innych niebiałkowych tioli [40]. Dlatego reakcje S-nitrozylacji stanowią zarówno możliwość odwracalnej kowalencyjnej modyfikacji grup –SH, jak i sposób magazynowania NO w postaci SNT. Na tej drodze może również dochodzić do trwałego utleniania grup –SH do disiarczków. Heterolityczny rozpad SNT następuje również z powstawaniem kationu nitrozoniowego w procesie S-transnitrozylacji (p. podrozdział 9.1.2).

9.1.3.2. Homolityczny rozpad S-nitrozotioli (SNT) z uwolnieniem tlenu azotu

Idea „magazynowania” NO w postaci SNT nie jest nowa i jako pierwsze pojawiły się doniesienia o „wrażliwych na światło” czynnikach wywołujących relaksację naczyń [41]. Rozkład termiczny lub fotochemiczny SNT *in vitro* prowadzi do uwalniania się NO, jednak reakcje te wydają się nie mieć znaczenia fizjologicznego [42, 43].



Jedna z możliwych reakcji uwalniania się NO z GSNO, jak sugeruje Wong, mogłaby przebiegać z udziałem FMNH₂ [44].



W osoczu SNT występują głównie w postaci S-nitrozoalbuminy (AlbSNO) [45], w erytrocytach jako nitrozyłowe kompleksy z żelazem hemowym [46] oraz jako S-nitrozohemoglobina (HbSNO) [35], natomiast wewnątrzkomórkowo dominującą postacią jest S-nitrozoglutation (GSNO). Istnieją różne mechanizmy, które uważa się za odpowiedzialne za transfer NO w krwi i w osoczu. Pierwszy, który jest redukującą bioaktywacją, to homolityczny rozpad SNT (S-nitrozoalbuminy) z uwolnieniem dyfundującego do komórek NO [47]. Stwierdzono, że na uwalnianie się NO z SNT decydujące znaczenie mają takie komponenty osocza, jak białkowe tiole (albumina) i askorbinian [47, 48, 49, 50].

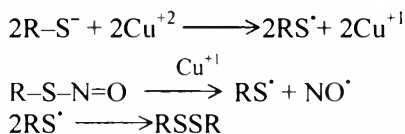


Drugi mechanizm biodegradacji SNT osocza jest związany z reakcjami S-nitrozylacji. Wysokie stężenie w osoczu albuminy (będącej białkowym tiolem) w stosunku do niskich stężeń niskocząsteczkowych tioli, jak: GSH i cysteina będzie zdecydowanie faworyzować powstawanie AlbSNO [17, 51]. Dlatego farmakologiczne działanie niskocząsteczkowych S-nitrozotioli będących donorami NO może być znacznie ograniczone z powodu przejmowania NO⁺ przez albuminy (S-transnitrozylacja albumin). Dlatego możliwość zakłócania istniejącej w osoczu równowagi poprzez „manipulowanie” poziomem niskocząsteczkowych tioli np. cysteiny może prowadzić do bioaktywacji AlbSNO prowadzącej do powstania S-nitrozocysteiny (CySNO), która ze względu na swoją nietrwałość, w odróżnieniu od AlbSNO, będzie skuteczniejszym donorem NO dla komórek śródbłonna [51].

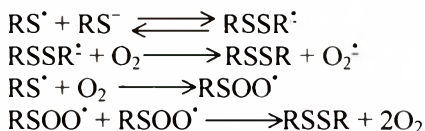
GSNO może w pewnych warunkach uwalniać NO na drodze homolitycznej [50], jednak jego główną funkcją jest transfer NO^+ na inne tiole, czyli udział w reakcjach S-transnitrozylacji [17].

Rozkład SNT z udziałem jonów metali

Inny możliwy biologiczny mechanizm związany z uwolnieniem NO to homolityczna degradacja SNT pod wpływem jonów miedzi (Cu^{+1}) do NO i disiarczków [48, 49, 50]. W fizjologicznych warunkach kation Cu^{+1} ulega spontanicznemu utlenianiu do kationu Cu^{+2} , tworzącego kompleksy z białkami. Redukcja związanego z białkami kationu Cu^{+2} do Cu^{+1} jest możliwa z udziałem anionu tiolanowego, który zawsze pozostaje w równowadze z SNT [48, 49]. Zatem w obecności Cu^{+2} i anionów tiolanowych (RS^-) możliwy jest rozkład SNT do NO i disiarczków.



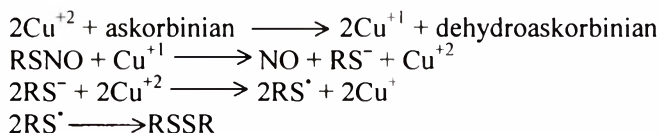
Reakcji tej towarzyszy jednak powstawanie rodnika tylowego [48, 49], co zawsze oznacza niebezpieczeństwo kaskady reakcji prowadzących do powstawania RFT (p. rozdział 1).



Do jednoelektronowego utleniania grup sulfhydrylowych z powstaniem rodników tyliowych RS^\bullet i kaskadowej reakcji prowadzącej do peroksydacji lipidów może również dochodzić pod wpływem ONOO^- [6, 22].

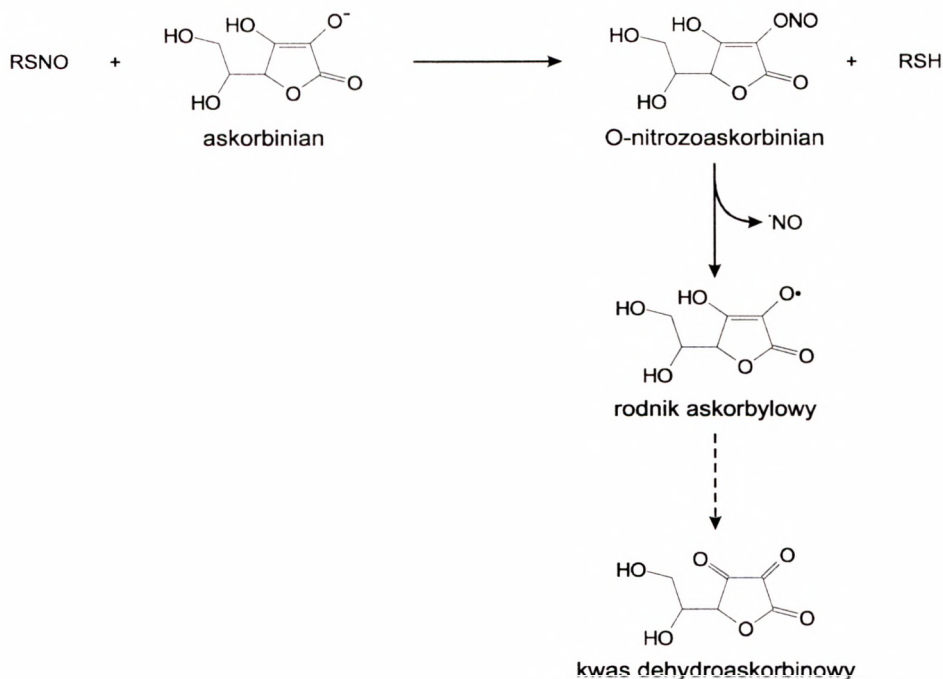
Potwierdzeniem, że rozpad SNT do NO może następować z udziałem Cu^{+1} , jest fakt, że specyficzny chelator tego jonu – neokupreina – hamuje w systemach bezkórkowych zarówno uwalnianie NO z SNT, jak i indukowaną przez SNT relaksację naczyń [47, 52].

Redukcja w tkankach Cu^{+2} do Cu^{+1} jest również możliwa z udziałem niskich stężeń askorbinianu. Powstające jony tiolanowe w reakcji utleniania Cu^{+1} mogą dodatkowo spełniać redukcyjną rolę względem powstających kationów Cu^{+2} [50, 51].



Zatem SNT dzięki reakcjom redukcji Cu^{+2} do Cu^{+1} przebiegającym zarówno z udziałem tioli (anionu tiolanowego), jak i askorbinianu mogą ulegać dekompozycji do NO i disiarczków, a mechanizm ten wydaje się bardzo prawdopodobnym scenariuszem uwalniania NO z SNT w komórkach. Dlatego uważa się, że askorbinian i tiole w powiązaniu z kationami miedzi biorą udział w biologicznym mechanizmie biodegradacji SNT, prowadzącym do homolitycznego uwolnienia NO [48, 49, 50]. Zatem z udziałem kationów Cu^{+2} może następować synteza SNT [9, 12], podczas gdy pod

wpływem Cu^{+1} może następować rozpad SNT i stanowi to przykład, jak biologiczna aktywność może zależeć od stopnia utlenienia jonu metalu.



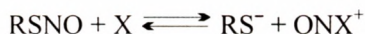
Ryc. 3. Biodegradacja S-nitrozotiołu (SNT) z udziałem askorbinianu (wg Holmesa i Wiliamsa [53] zmodyfikowana)

Przy wyższych stężeniach askorbinianu możliwa jest również biodegradacja SNT do NO bez udziału kationów miedzi. Taki niezależny od jonów miedzi homolityczny rozkład SNT następuje wtedy, kiedy poziom jonów tiolanowych znacznie się obniży np. w wyniku wzmożonej syntezy SNT [53]. W reakcji tej (w zależności od pH) może brać udział mono- i dianionowa forma askorbinianu.



Mechanizm tej reakcji polega na nukleofilnym ataku askorbinianu na atom azotu w RSNO, z powstaniem przejściowego metabolitu – nitrozoaskorbinianu i z uwalnianiem się tioli (ryc. 3). Powstający O-nitrozoaskorbinian następnie rozpada się wolnorodnikowo do NO i względnie mało reaktywnego rodnika askorbylowego, który w nie do końca poznanym procesie przechodzi w kwas dehydroaskorbinowy [53]. Oznacza to, że askorbinian wykazuje zarówno możliwość obniżania poziomu $\text{O}_2^{\cdot-}$, jak i uwalniania NO z SNT komórek i osocza [50, 51, 53]. Spostrzeżenia te wskazują, że SNT mogą pełnić rolę elektrofilnego czynnika nitrozylującego także w stosunku do

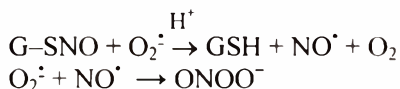
askorbinianu, a niewykluczone, że również w stosunku do innych grup nukleofilnych (X) [54, 55].



Takimi nukleofilnymi akceptorami (X) może być, jak to wykazano ostatnio, wiele nukleofilnych związków siarki, takich jak SO_3^{-2} , MeS^- , $\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$ i SCN^- [55].

Rozkład SNT w reakcjach z anionorodnikiem ponadtlenkowym ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Możliwa jest również reakcja redukcji GSNO przez anionorodnik ponadtlenkowy ($\text{O}_2^{\cdot-}$) do GSH i NO, czemu dodatkowo towarzyszy powstawanie ONOO^- [56, 57].



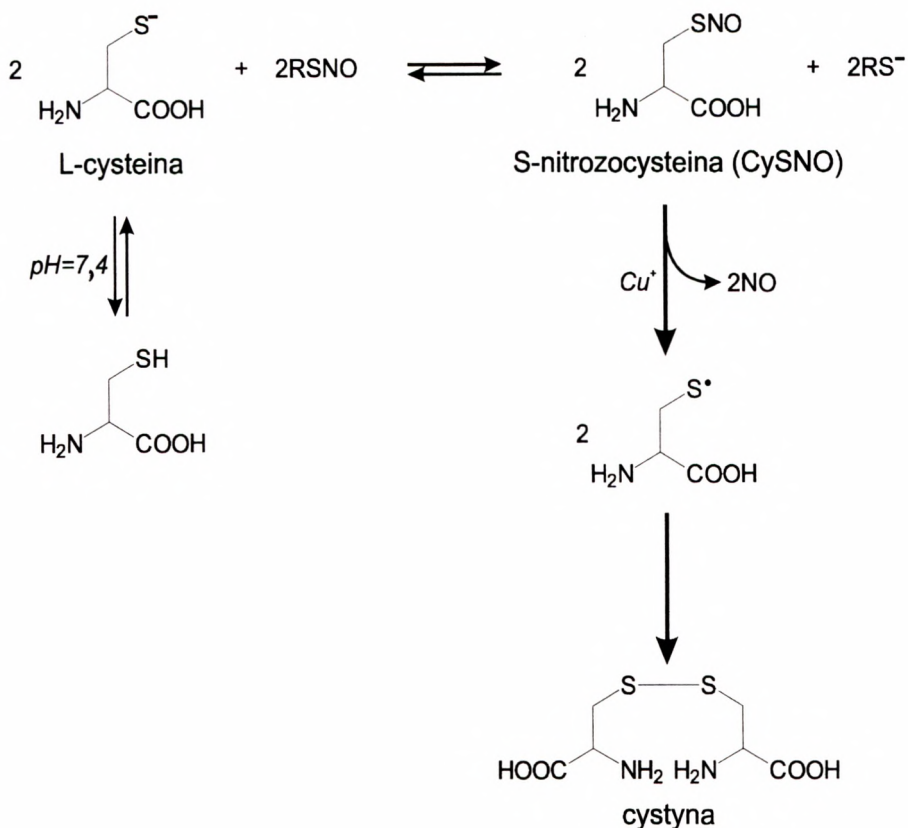
W ten sposób, podczas rozkładu jednej cząsteczki SNT, może następować konsumpcja dwóch cząsteczek $\text{O}_2^{\cdot-}$ z równoczesnym powstaniem nadtlenoazoty (ONOO⁻).

Oznacza to, że anionorodnik ponadtlenkowy ($\text{O}_2^{\cdot-}$) poprzez możliwość udziału zarówno bezpośredniej reakcji dekompozycji SNT, jak i poprzez reakcję „wyłapywania” NO prowadzącej do ONOO⁻ może działać jako modulator poziomu SNT i NO w komórkach. W fizjologicznych warunkach magazynowanie NO w postaci SNT uważa się za mechanizm chroniący przed niebezpieczną reakcją powstawania ONOO⁻ [9, 14]. Jednak w sytuacji, kiedy dochodzi do nadmiernego wzrostu zarówno poziomu $\text{O}_2^{\cdot-}$, jak i SNT (np. endotoksemii) [58], $\text{O}_2^{\cdot-}$ może dodatkowo promować uwalnianie NO z SNT, co jeszcze bardziej będzie nasilać powstawanie toksycznego ONOO⁻ [21]. Należy zwrócić uwagę, że reakcja $\text{O}_2^{\cdot-}$ z SNT jest znacznie wolniejsza od reakcji $\text{O}_2^{\cdot-}$ z NO, prowadzącej do ONOO⁻ [55, 57]. Oznacza to, że na tej drodze biodegradacja SNT do NO może mieć znaczenie tylko w przypadkach znacznie podwyższonego stężenia SNT i $\text{O}_2^{\cdot-}$ [58]. Pojawiają się doniesienia, że pod wpływem $\text{O}_2^{\cdot-}$ dochodzi również do biodegradacji GSNO z powstaniem NO_2^- i NO_3^- [57–59].

Dlatego przyjmuje się, że biodegradacja SNT w reakcji z $\text{O}_2^{\cdot-}$ jest wysoce prawdopodobnym mechanizmem pozwalającym na modyfikowanie zarówno poziomu RFT, jak i poziomu RFA.

Rozkład S-nitrozotoli (SNT) w wyniku połączenia reakcji S-transnitrozylacji z homolitycznym rozpadem

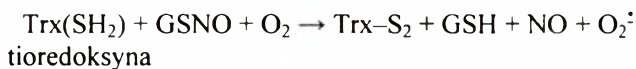
Wiadomo, że S-nitrozocysteina (CysSNO) jest związkiem bardzo nietrwałym, podczas gdy GSNO, podobnie jak S-nitrozo-N-acetylofenilaminy (SNAP) są połączeniami trwałymi [42]. CysSNO jest tak mało stabilna, że praktycznie nie można jej wyizolować w czystej postaci, dlatego do badań laboratoryjnych w roztworach przeprowadza się nitrozylację cysteiny *in situ* [58, 60]. Z tego powodu coraz częściej przyjmowany jest pogląd, że stabilne SNT mogłyby w reakcjach S-transnitrozylacji przekazywać swoją grupę nitrozylową na mniej stabilne SNT, takie jak właśnie CySNO, które mogłyby z udziałem kationów Cu^{+1} ulegać dekompozycji z uwolnieniem NO i z powstaniem disiarczku – cystyny [60] (ryc. 4).



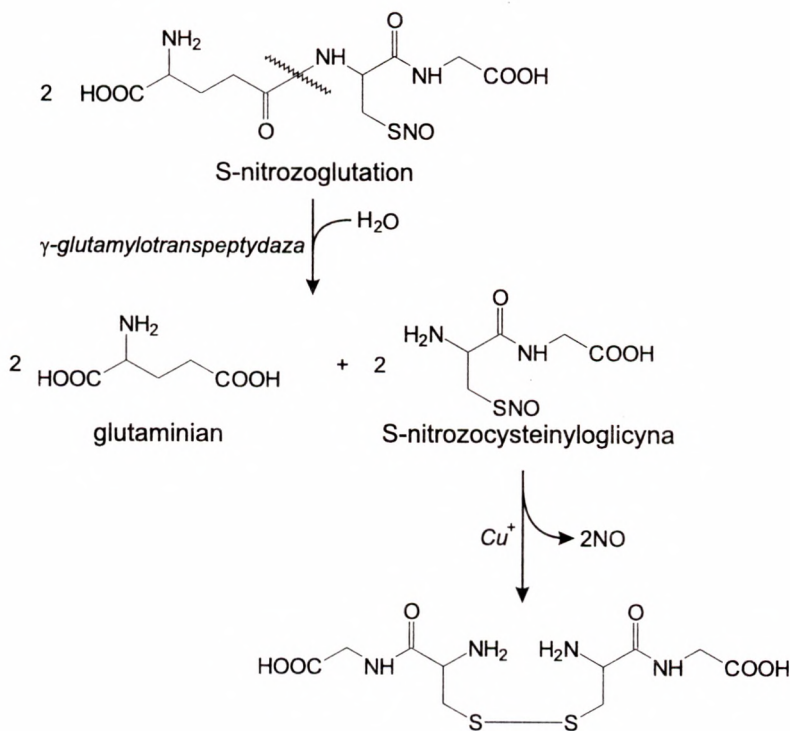
Ryc. 4. Reakcja S-transnitrozylacji do nietrwalej S-nitrozocysteiny (CySNO) ulegającej homolitycznemu rozpadowi z udziałem Cu^{+1} do NO

9.1.3.3. Enzymatyczne reakcje biodegradacji S-nitrozotioili

Opisano szereg enzymów, takich jak: reduktaza tioredoksyny, peroksydaza glutationowa, γ -glutamylotranspeptydaza (γ -GT) i oksydaza ksantynowa, dla których substratami są niskocząsteczkowe SNT [prace przeglądowe: 12, 28]. Powstający endogenne NO może być magazynowany w postaci GSNO, a następnie z udziałem reduktazy tioredoksynowej ulegać homolitycznemu rozszczepieniu do NO i GSH [61].



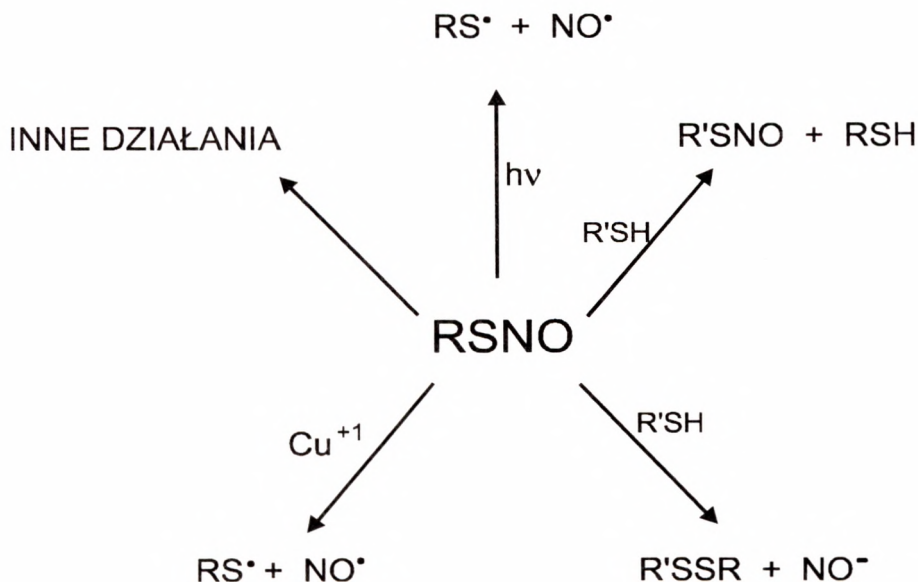
Do uwolnienia się NO z GSNO może również dochodzić pod wpływem peroksydazy glutationowej [62], natomiast oksydaza ksantynowa katalizuje przemiany CySNO i GSNO do toksycznego ONOO⁻ [63]. GSNO może być również substratem dla γ -glutamylotranspeptydazy (γ -GT), enzymu zlokalizowanego po zewnętrznej stronie błony komórkowej [64] (ryc. 5). Wykazano, że w reakcji katalizowanej przez γ -GT K_m w stosunku do GSNO ma podobną wartość jak w stosunku do GSH [64]. Co ciekawe, enzymatyczna degradacja GSNO z udziałem błonowych enzymów γ -GT i towarzyszącej jej dipeptydazy (DP) prowadzi do powstawania mało stabilnych SNT, tj. S-nitrozocysteinyloglicyny i S-nitrozocysteiny (CySNO) mogących łatwo w obecności Cu^{+1} uwalniać NO [42]. Enzym γ -GT ma szczególne znaczenie w procesie biodegradacji GSNO w nerkach, ponieważ w tym narządzie jego aktywność jest prawie 900x wyższa niż w wątrobie [65]. Uwalnianie NO z niskocząsteczkowych SNT może również następować z udziałem dysmutazy ponadtlenkowej ($CuZn$ -SOD) [57]. Możliwość enzymatycznego uwalniania NO z SNT oznacza, że w fizjologicznych warunkach może to następować bez powstawania niebezpiecznych rodników tylowych.



Ryc. 5. Udział γ -glutamylotranspeptydazy i kationów Cu^+ w uwalnianiu NO z S-nitrozoglutationu (wg Al-Sa'doni [42] zmodyfikowana)

Wprawdzie drogi biochemicznej dekompozycji RSNO *in vivo* nie do końca są poznane, to jednak redukcyjny rozkład SNT w obecności jonów metali, askorbinianu i tioli wydaje się możliwym mechanizmem w komórkach. Ponadto możliwość reakcji NO z $O_2^{\cdot -}$, a także z różnymi pośrednimi produktami peroksydacji lipidów może wpływać na rozmiar peroksydacyjnych uszkodzeń.

Podsumowując, biologiczna aktywność SNT będzie zależeć od równowagi pomiędzy reakcjami powstawania i biodegradacji. Mechanizm, poprzez który SNT będą wykazywać swoją biologiczną aktywność, wydaje się związany zarówno z reakcjami heterolitycznego rozpadu, jak i z homolitycznym uwalnianiem NO lub z powiązaniem obu tych procesów. Na kierunek tych przemian w komórkach będzie wpływać stosunek stężeń S-nitrozotiole, tioli i reaktywnych form tlenu. Poziom SNT będzie także uzależniony od aktywności enzymów, dla których odpowiednie SNT mogą być substratami. Produktami biodegradacji SNT mogą zatem być: NO, ONOO⁻, NH₂OH, NO⁺, HNO, a także S-nitrozocysteinyloglicyna (CyGlySNO) i CySNO – produkty enzymatycznej hydrolizy GSNO z udziałem γ -GT i dipeptydazy. Wszystkie te połączenia charakteryzują się szerokim i różnorodnym zakresem bioaktywności. Zatem od katabolitycznych reakcji SNT, zarówno enzymatycznych, jak i nieenzymatycznych, będzie zależeć bioaktywacja „rezerwuaru NO”, jakimi są SNT. Główna uwaga w chwili obecnej skupia się na 3 głównych reakcjach, jakim ulegają SNT: (1) uwalnianiu NO, (2) S-transnitrozylacji, (3) powstawaniu disiarczków (ryc. 6).



Ryc. 6. Główne biologiczne reakcje S-nitrozotiole: uwalnianie NO, S-transnitrozylacja i powstawanie disiarczków

Podawanie egzogennych prekursorów NO, takich jak organiczne azotany, nitroprusydek sodu, a także specyficznych inhibitorów syntazy NO, stwarza możliwość modulowania w celach farmakologicznych poziomu NO i SNT. Decydujący wpływ na poziom SNT *in vivo* będą również wykazywać jony metali oraz obecność reduktorów, takich jak tiole i askorbinian. Powszechnie przyjmuje się, że uwalnianie się NO z RSNO może następować z udziałem tioli (GSH), askorbinianu i jonów metali. Ponieważ stężenia wszystkich tych czynników w komórkach wątroby i nerek są wysokie, dlatego dekompozycja SNT na tej drodze w tych narządach wydaje się prawdopodobna i szybsza, niż to ma miejsce w osoczu [14, 16, 17]. Możliwościami szybkiego przyjmowania NO z SNT, jak stwierdzono, charakteryzują się komórki śródbłónka [60]. Natomiast SNT występujące w osoczu to głównie AlBSNO i GSNO, które charakteryzują się długim okresem połowicznego życia. Oznacza to, że pozakomórkowo promowane jest wolne, lecz nieustanne uwalnianie się NO z SNT, na co wpływają takie komponenty osocza, jak tiole, białka i askorbinian [51].

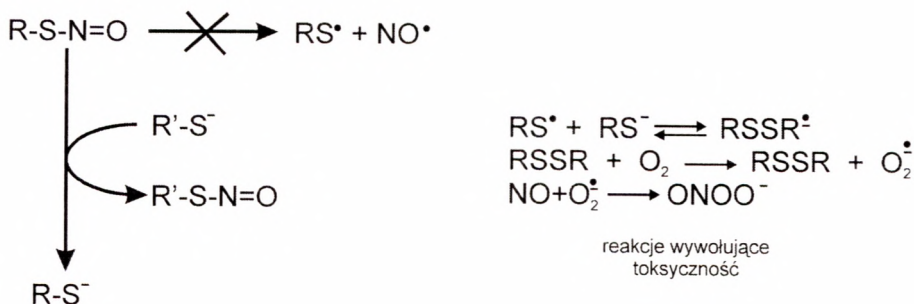
9.1.4. Właściwości biologiczne i farmakologiczne nitrozotiole (SNT)

Endogennie występujące SNT zarówno w cytozolu komórek, jak i w osoczu stanowią ilościowo dominującą formę redoksową NO i uważane są za formę upakowania i transportu NO. Reakcje S-nitrozylacji białek są również uważane za sposób modulowania w komórkach sygnałów transdukcji.

Chociaż w pełni ustalono, że metaboliczna droga L-argininy do NO pośredniczy w zjawisku relaksacji naczyń krwionośnych, jak również zaakceptowano, że śródbłonkowym czynnikiem relaksującym (EDRF) jest NO, to jednak wciąż pojawiają się nowe spostrzeżenia i sugestie, że funkcję tę mogą także pełnić SNT [66, 67, 68, 69]. Oznacza to, że SNT są nie tylko intermediatami w metabolizmie NO, ale mogą także wykazywać bezpośrednią rolę biologiczną. Ponieważ SNT charakteryzują się zróżnicowaną trwałością, ich bioreaktywność w określonych warunkach biologicznych może być różna. Szybkość powstawania i stabilność poszczególnych SNT zależą od stężenia jonów tiolanowych $-S^-$, a więc od wartości pK grup sulfhydrylowych ($-SH$). Zatem powstawanie i biodegradacja, a w konsekwencji biologiczne właściwości SNT będą funkcją pK grupy sulfhydrylowej, a także będą zależne od pH oraz od tiolowego statusu redoksowego komórek [6, 11]. Wszystkie tiole, zarówno nisko-, jak i wysoko-cząsteczkowe (białka), poprzez reakcję S-nitrozylacji przedłużają *in vivo* czas życia NO, dzięki czemu może on działać ze zwiększoną skutecznością. Oznacza to, że tlenek azotu (NO) w nieobecności tioli byłby cząsteczką „niechronioną”, a przez to i nieefektywną fizjologicznie [70, 71]. Powstawanie SNT to także ochrona przed toksycznością nadmiaru $ONOO^-$, NO_2^- , NO, O_2^- i związanego z tym stresu „nitrozylującego”. Nadmierna indukcja syntazy NO prowadzi do wzrostu produkcji NO i uszkodzeń zwanych szokiem endotoksycznym, czemu towarzyszy spadek poziomu GSH [58]. Obniżenie poziomu GSH jeszcze bardziej zwiększa wrażliwość komórek na cytotoksyczność reaktywnych form azotu [71]. Dlatego jednym z aspektów antyoksydacyjnego działania tioli może być również ochrona przed prooksydacyjnym działaniem NO. Paradoksalnie, jak to ma miejsce w przypadku homocysteiny, istnieje również odwrotna możliwość, tzn. zmniejszania toksyczności tioli w wyniku reakcji S-transnitrozylacji. Jak wiadomo, podwyższony poziom w osoczu tiolowego aminokwasu ho-

mocysteiny prowadzi do arteriosklerozy [72], czemu skutecznie przeciwdziała S-nitrozyłacja homocysteiny [73, 74].

W sytuacji nadmiernego, homolitycznego uwalniania NO z SNT, takich jak S-nitrozohomocysteina (HcSNO) i CySNO, może wystąpić neurotoksyczne działanie [74], co może prowadzić do zahamowania biosyntezy DNA [75]. Sytuacja taka jest możliwa w warunkach szoku endotoksycznego, tj. nadmiernego powstawania $O_2^{\cdot -}$ i przy wysokich stężeniach SNT [58]. Wtedy na skutek nadmiernego uwalniania tlenku azotu (NO) z SNT pod wpływem $O_2^{\cdot -}$ może nastąpić wzrost syntezy nie tylko toksycznego $ONOO^-$, ale również niebezpiecznych rodników tiylowych $-S^{\cdot}$. Obserwowanej w tych warunkach neurotoksyczności nadmiaru SNT mogą zapobiegać zarówno tiole (ryc. 7), jak i dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) [74]. Tirole mogą bowiem w reakcjach S-transnitrozyłacji przejmować na siebie nadmiar NO i w ten sposób uniemożliwiać powstawanie zarówno toksycznego rodnika tiylowego (RS^{\cdot}), jak i $ONOO^-$.



Ryc. 7. Możliwość zapobiegania przez tirole toksyczności S-nitrozotiole (SNT) związanej z homolitycznym uwalnianiem się nadmiaru NO

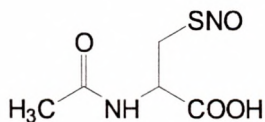
Pojawiły się również doniesienia, że GSH w postaci GSNO może stać się nośnikiem z cytoplazmy do jądra takich reaktywnych form azotu, jak: NO^{\cdot} , NO^{\cdot} , NO^- i w ten sposób brać aktywny udział w mutagennym procesie wywoływanym przez nitroglicerynę (NTG) i nitroprusydek sodu (NPS) [76]. GSNO mógłby także poprzez reakcje S-nitrozyłacji prowadzić do powstawania disiarczków i inaktywować enzymy związane z naprawą DNA [37, 76]. Ponieważ S-nitrozotiole są lekami stosowanymi w terapii, dlatego powyższe obserwacje stanowią sygnał o potencjalnie możliwych niebezpieczeństwach związanych z ich podawaniem.

SNT są alternatywnymi do nitrogliceryny i innych organicznych azotanów donorami NO i lekami stosowanymi w problemach z krążeniem [32] i w odróżnieniu od tych ostatnich niewywołującymi tolerancji [77]. Wykazują swoją biologiczną aktywność w szeregu tak ważnych fizjologicznie procesów, jak: (1) relaksacja mięśni gładkich, (2) hamowanie agregacji płytek, (3) neurotransmisja, (4) immunoregulacja, (5) proliferacja komórek śródbłonna [9, 12].

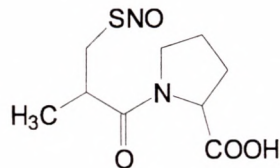
U człowieka GSNO znacząco hamuje agregację płytek i następuje to w dawkach, które jeszcze nie wpływają na system naczyniowo-sercowy [78]. Stwierdzono również hamujący wpływ GSNO na cykl życia *Plasmodium Falciparum* [79]. Dlatego w chwili obecnej obserwuje się intensywne poszukiwania nowych S-nitrozyłowych pochodnych oraz prowadzone są badania nad ich farmakologicznym działaniem [80]. Przykłady

najbardziej znanych syntetycznych SNT, którym w badaniach poświęca się największą uwagę, znajdują się na ryc. 8.

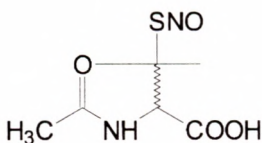
Podsumowując, SNT mogą działać głównie jako donory NO, ale także jako źródło NO^+ w reakcjach S-transnitrozylacji, mogą również ulegać rozpadowi do NO^- i stanowić intermediały na drodze do utleniania grup $-\text{SH}$ do disulfidów.



S-nitrozo-N-acetylocysteina



S-nitrozokaptopril



S-nitrozo-N-acetylopenicylamina
(SNAP)

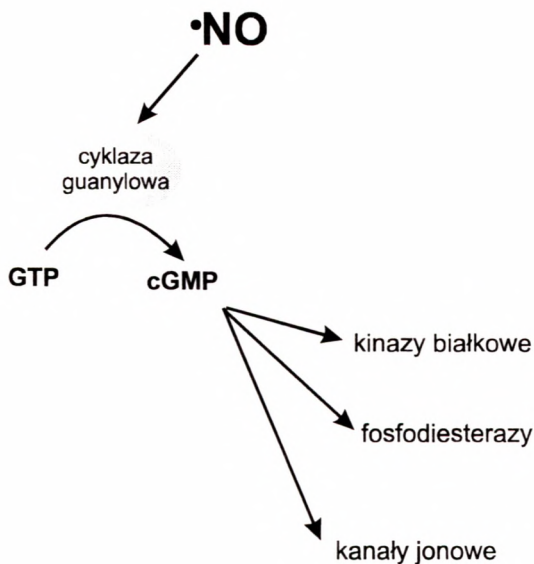
Ryc. 8. Syntetyczne S-nitrozotiole

9.2. S-nitrozylacja białek

9.2.1. Wprowadzenie

Reaktywnym formom tlenu (RFT) tradycyjnie zarzuca się peroksydacyjne uszkodzenie komórek, równocześnie jednak są postrzegane jako cząsteczki o właściwościach sygnałowych i regulacyjnych [81, 82]. Również tlenkowi azotu (NO) i jego reaktywnym postaciom (RFA) przypisuje się zarówno działanie toksyczne, jak i udział w procesach regulacyjnych [1, 2, 42, 83]. Drogi sygnałów transdukcji związane z NO można podzielić na zależne i niezależne od cGMP [2, 3, 4]. Cyklaza guanylowa jest hemoproteiną, enzymem aktywowanym przez koordynacyjne wiązanie się NO z jonem żelaza hemu. Towarzyszące temu zmiany konformacyjne enzymu umożliwiają katalizę reakcji przekształcania GTP w cGMP, co ostatecznie prowadzi do relaksacji mięśni gładkich naczyń krwionośnych i antyagregacyjnego działania [3, 4] i jest przykładem regulacyjnego działania NO z udziałem cGMP (ryc. 9). W mechanizmach regulacyjnych niezależnych od cGMP, RFA poprzez swój bezpośredni wpływ na strukturę białek modulują biologiczne funkcje tych cząsteczek. Mechanizmy sygnałowe niezależne

od cGMP mogą być związane z reakcjami o charakterze addycyjnym, jak i oksydacyjno-redukcyjnym. Oznacza to, że NO może oddziaływać na białka zarówno na drodze addycji, jak to czynią fosforylujące kinazy, jak również poprzez sygnały redokso-we podobnie do RFT [28, 84, 85].



Ryc. 9. Drogi sygnałów transdukcji zależne od cGMP

Reakcjami bezpośredniego działania NO na białka jest nitrozyłacja grup –SH reszt cysteiny, a także nitrozyłacja reszt tyrozyny, Fe^{+2} hemu lub też jonów żelaza białek żelazowo-siarkowych [4, 86, 87]. Spośród reakcji nitrozyłacji zdecydowanie preferowanymi jako mechanizmy regulacyjne jest S-nitrozyłacja reszt cysteiny [84, 85]. Grupy –SH odgrywają niezwykle ważną rolę dla struktury i funkcji białek [40], a reakcje S-nitrozyłacji grup sulfhydrylowych (–SH) stanowią jeden z możliwych rodzajów po-translacyjnej, kowalencyjnej modulacji tych cząsteczek [84, 85] (ryc. 1). Podczas inhalacji myszy tlenkiem azotu (NO) S-nitrozyłacja reszt cysteiny stanowi główne zmiany kowalencyjne, jakim ulegają białka w komórkach [86]. W przypadku hemoglobiny tlenek azotu (NO) może modulować biologiczną aktywność zarówno poprzez bezpośrednią interakcję z układem hemowym, jak i poprzez S-nitrozyłację reszt cysteiny [87]. Procesem regulacji aktywności białek może być również nitrozyłacja metali przejściowych zlokalizowanych w centrach aktywnych i allosterycznych enzymów [46]. Biologiczne efekty zarówno reakcji S-nitrozyłacji białek, jak i koordynacyjnego wiązania NO z kationami metali, mogą mieć charakter nie tylko regulacyjny i osłaniający, lecz w pewnych warunkach mogą również prowadzić do toksycznego działania [1, 88, 89].

W warunkach stresu oksydacyjnego NO może reagować z $\text{O}_2^{\cdot-}$ i przechodzić w toksyczny nadtlenoazotyn (ONOO^-). Reakcje nitrozyłacji reszt tyrozyny w białkach są postrzegane wyłącznie jako efekt związany z toksycznością powstającego z NO nadtlenoazotynu (ONOO^-) [21, 90]. Potwierdzeniem tego jest fakt, że u pacjentów

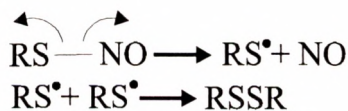
w szoku septycznym obserwuje się niezwykle intensywny wzrost poziomu nitrotyrozyny [90]. Uważa się, że nitrozylacja reszt tyrozyny następuje dopiero w momencie drastycznego obniżenia poziomu grup $-SH$ w komórkach na skutek stresu oksydacyjnego.

Spośród reaktywnych form azotu (RFA) $ONOO^-$ jest wyłącznie postrzegany jako czynnik toksyczny prowadzący do oksydacyjnych uszkodzeń [21]. Natomiast S-nitrozotiole, jak S-nitrozoglutation (GSNO), są uważane za związki o właściwościach nitrozylujących [9]. Oznacza to, że tiole kontrolują w komórkach zarówno poziom NO, jak i $ONOO^-$, dzięki czemu odgrywają istotną rolę w toksyczności wywołanej nadmiarem NO [88], a tym samym decydują o fizjologicznej roli NO [9].

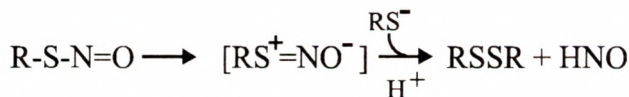
Reakcje S-nitrozylacji białek to z jednej strony szybki i odwracalny sygnał transdukcji, ale to również sposób magazynowania i transportu NO. Dzięki reakcjom S-nitrozylacji biologiczne działanie NO nie ogranicza się tylko do kilkusekundowego czasu istnienia tej cząsteczki, lecz pod postacią SNT możliwe jest długotrwałe modyfikowanie wielu procesów.

Reakcje S-nitrozylacji białek mogą również stanowić etap przejściowy na drodze utleniania tioli do disiarczków lub do mieszanych disiarczków. Do powstawania mostków disiarczkowych może dochodzić zarówno w wyniku homolitycznego, jak i heterolitycznego rozbitcia wiązania pomiędzy azotem i siarką w S-nitrozotiolach ($R-S-N=O$).

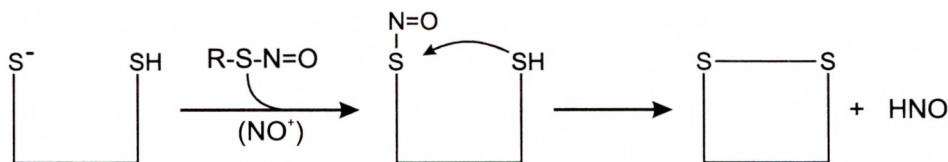
Homolityczny rozpad SNT ma następujący przebieg:



Natomiast reakcje heterolitycznego rozpadu SNT przebiegają z udziałem jonów tiolanowych, czemu towarzyszy powstawanie disiarczków i anionu nitroksylowego (NO^-).



Na tej drodze w cząsteczkach białek w przypadku bliskiego sąsiedztwa drugiej grupy sulfhydrylowej ($-SH$) poprzez reakcję S-nitrozylacji może dochodzić do powstawania wewnątrzcząsteczkowych wiązań disiarczkowych [36] (ryc. 10). W przypadku aktywacji cyklazy guanylowej istnieje hipoteza, że niezależnie od reakcji nitrozylacji w centrum hemowym, konieczne jest również powstawanie – poprzez przejściową S-nitrozylację – disiarczków, których obecność jest warunkiem aktywności enzymu [9].

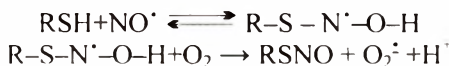


Ryc. 10. S-nitrozylacja jako etap pośredni na drodze powstawania mostków disiarczkowych w białkach

Powstawanie disiarczków i NO^- jako efektu reakcji S-nitrozylacji zostało również stwierdzone w przypadku anhidrazy węglanowej [91], papainy [92], a także w wyniku S-nitrozylacji hemoglobiny [35]. Oznacza to, że w fizjologicznych warunkach poprzez reakcje S-nitrozylacji może następować utlenienie grup $-\text{SH}$ w białkach do disiarczków.

9.2.2. Mechanizm i specyficzność reakcji S-nitrozylacji białek

Jeżeli chodzi o mechanizm reakcji S-nitrozylacji białek, to szczególnie interesująca wydaje się hipoteza Gowa i współpracowników [19], opisująca możliwość bezpośredniej reakcji NO z grupami $-\text{SH}$ z powstaniem rodnikowego intermediatu ($\text{R-S-N}^\bullet\text{-O-H}$), przekształcanego następnie do SNT.



W przypadku kiedy akceptorem elektronu będzie tlen (O_2), towarzyszy temu powstawanie anionorodnika ponadtlenkowego (O_2^\bullet). S-nitrozylacja białek może również zachodzić podczas łańcuchowych reakcji S-transnitrozylacji, w których kation nitrozo-niowy (NO^+) jest przekazywany z dawcy na kolejny akceptor (jon tiolanowy), aż do momentu krytycznej docelowej reakcji S-nitrozylacji [9, 11].



Reakcjom S-transnitrozylacji pomiędzy SNT i anionami tiolanowymi białek przypisuje się udział w transdukcji sygnałów w komórkach [9, 12, 84].

Reakcje S-nitrozylacji białek nie przebiegają przypadkowo, lecz charakteryzują się wysoką specyficznością, co oznacza, że są związane tylko z określonymi grupami $-\text{SH}$ w cząsteczkach białek. Na przykład, receptor rianodyny posiada w swej cząsteczce 84 grupy $-\text{SH}$, z których S-nitrozylacji może ulegać tylko 12 [93]. Dla lepszego zrozumienia specyficzności reakcji S-nitrozylacji białek proces ten można przyrównać do reakcji alkilacji grup $-\text{SH}$ białek pod wpływem N-etylomaleimidu (NEM). Pod wpływem NEM następuje w różnym stopniu zahamowanie aktywności enzymów z krytycznymi dla swej aktywności grupami $-\text{SH}$. Na przykład, zahamowanie aktyw-

ności dehydrogenazy aldehydu-3-fosfoglicerynowego (GAPDH) następuje przy 100-krotnie niższym stężeniu NEM niż w przypadku dehydrogenazy mleczanowej [94]. Podobna sytuacja może mieć miejsce w cząsteczkach białkowych ulegających reakcjom S-nitrozytacji. Oznacza to, że nitrozytacja jest związana tylko z określonymi grupami –SH w cząsteczce danego białka. W reakcjach S-transnitrozytacji konieczna jest obecność jonów tiolanowych ($-S^-$), dlatego im niższa będzie wartość pK grupy sulfhydrylowej, tym większe będzie prawdopodobieństwo jej transnitrozytacji [5, 9]. O specyficzności reakcji S-nitrozytacji może decydować także subkomórkowa lokalizacja syntazy NO i związane z tym lokalnie występujące stężenia NO. Zatem zależne od wartości pK różnice w reaktywnościach poszczególnych grup –SH, dostępności NO, a także od umiejscowienia grup –SH w obszarze bardziej lub mniej hydrofobowym cząsteczek białek będą decydować o możliwości reakcji S-nitrozytacji. Na przykład, pojedyncza grupa –SH w cząsteczce albuminy znajduje się w obszarze silnie hydrofobowym, co okazuje się mieć decydujący wpływ na kinetykę i termodynamikę reakcji S-transnitrozytacji tego białka [17, 95]. Albumina jest przykładem białka, które przechodzi w stosunkowo stabilną S-nitrozoalbuminę uważaną za główny rezerwuár NO w osoczu [9, 17].

W komórkach, w odróżnieniu od osocza, reakcje S-transnitrozytacji białek przebiegają przy bardzo wysokim, bo milimolowym stężeniu niskocząsteczkowego tiolu – tripeptydu glutationu (GSH). Oznacza to, że w komórkach czas życia każdego S-nitrozylowanego białka będzie zależeć od szybkości reakcji transferu NO^+ na wszechobecny i to w wysokim stężeniu GSH. Całkowicie odwrotna sytuacja będzie w osoczu, gdzie z kolei czas życia wszystkich niskocząsteczkowych SNT zależy od występującego w dużym stężeniu wysokocząsteczkowego tiolu – albuminy [17].

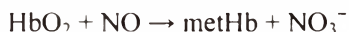
Reakcje S-nitrozytacji białkowych tioli uważa się za mechanizm regulacyjny podobny w swym przebiegu do reakcji fosforylacji białek z udziałem kinaz. Dlatego S-nitrozytacja białek jest coraz częściej postrzegana jako alternatywna do fosforylacji możliwość kowalencyjnej modulacji cząsteczek białek [28]. Oba te procesy odznaczają się zresztą szeregiem cech wspólnych, i tak, jeżeli reakcje fosforylacji można uważać za transfer fosforanu, to reakcje S-nitrozytacji za transfer kationu nitrozonowego (NO^+). Fosforylacja jest kowalencyjnym wiązaniem fosforanu do reszt seryny, treoniny czy tyrozyny, natomiast S-nitrozytacja jest kowalencyjnym wiązaniem NO do reszty cysteiny lub koordynacyjnym wiązaniem z jonami metali przejściowych. Zarówno fosforylacja, jak i S-nitrozytacja reguluje biologiczną aktywność cząsteczek białkowych, dlatego oba procesy mogą brać udział w transdukcji sygnałów.

Reakcje S-transnitrozytacji reszt cysteiny w białkach obserwuje się zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i w patologicznych. Obecność S-nitrozylowanych białek stwierdzono w gruczole ślinowym, w osoczu, w wydzielinie dróg oddechowych i w neutrofilach [9, 28]. Bakteriostatyczne działanie azotynów okazało się być następstwem zarówno S-nitrozytacji krytycznych grup –SH białek błonowych bakterii, jak również skutkiem zahamowania poprzez przejściową S-nitrozytację aktywności dehydrogenazy aldehydu-3-fosfoglicerynowego, a w konsekwencji glikolizy [28, 96]. Catani i współpracownicy [97] wykazali również, że XIII czynnik krzepnięcia krwi (transglutaminaza) ulega zahamowaniu w wyniku reakcji nitrozytacji reaktywnych grup –SH. Oznacza to, że również proces krzepnięcia krwi może być regulowany poprzez reakcje S-nitrozytacji. Do białek, w przypadku których stwierdzono, że w fizjologicznych warunkach ulegają reakcjom S-nitrozytacji, należą: hemoglobina, liczne enzymy, czynniki transkrypcyjne, receptory, transportery i kanały jonowe [9, 28, 96].

Oznacza to, że proces S-nitrozylacji białek może wpływać zarówno na metabolizm, jak i na mechanizmy związane z transmisją sygnałów w komórkach [98].

9.2.3. S-nitrozylacja hemoglobiny

Do białek, w stosunku do których NO wykazuje swoje najwyższe powinowactwo, należy hemoglobina. Koordynacyjne wiązanie NO z jonem Fe^{+2} hemu jest tak silne, że konkurencyjne ligandy, takie jak O_2 czy CO, pozostają praktycznie bez wpływu na związany koordynacyjnie NO [4, 6]. Hemoglobina poprzez niezwykle skuteczne „wyłapywanie” NO prowadzi do zahamowania fizjologicznej roli NO w układzie krążenia [99]. Z tego powodu jest uważana za antagonistę NO w układzie naczyniowo-sercowym, ponieważ powoduje niedobór NO, co prowadzi do zahamowania aktywności cykazy guanylowej i spadku poziomu cGMP, co uniemożliwia hipotensyjne i antyagregacyjne działania. W obecności tlenu reakcja NO z hemoglobiną może prowadzić również do methemoglobiny i azotanów [99, 100].



Niezależnie od reakcji niweczących biologiczną aktywność NO, istnieje również możliwość interakcji pomiędzy hemoglobiną i NO, która pozwala na zachowanie biologicznej aktywności NO. Badania Stamlera wykazały bowiem możliwość S-nitrozylacji reszty cysteiny ($\text{Cys } \beta_{93}$) w oksyhemoglobinie z powstaniem S-nitrozohemoglobiny [99, 100]. Przebieg tej reakcji zależy od allosterycznej postaci hemoglobiny i może jej ulegać tylko konformacja R, czyli postać utlenowana hemoglobiny (HbO_2). Dysocjacja tlenu połączona z allosterycznym przejściem ze struktury R (utlenowanej) do T (nieutlenowanej) równocześnie prowadzi do uwalniania się NO z grupy $-\text{SH}$ hemoglobiny. W ten sposób tlenek azotu (NO) z S-nitrozohemoglobiny może być przenoszony w erytrocytach na obecny tam glutation (GSH) z powstaniem GSNO [100]. Oznacza to, że w zależności od gradientu stężenia tlenu i związanych z tym zmian konformacyjnych hemoglobiny może nastąpić wiązanie NO przez S-nitrozylację, a następnie transport i uwalnianie NO lub transfer kationu nitrozoniowego NO^+ na inne tiole (np. GSH). Dzięki temu hemoglobina jest białkiem transportującym również NO z płuc do tkanek i na tej drodze może odgrywać aktywną rolę w regulacji przepływu krwi w naczyniach krwionośnych. Zgodnie z tą hipotezą, NO byłby transportowany w erytrocytach w postaci S-nitrozohemoglobiny (HbSNO), a następnie w reakcjach S-transnitrozylacji przenoszony na niskocząsteczkowe tiole (cysteina i GSH) z powstaniem CySNO i GSNO przekazywanych do osocza. Na drodze transportu pomiędzy erytrocytami a układem naczyniowym ważną rolę mogłaby odgrywać występująca w osoczu w nadmiarze albumina [17]. Jednakże pełny obraz interakcji, jaka może mieć miejsce pomiędzy hemoglobiną, niskocząsteczkowymi S-nitrozotiolami i albuminą a układem naczyniowym, wydaje się złożony i w chwili obecnej jeszcze daleki od wyjaśnienia [17]. Pawłowski [101] wykazał ponadto, że S-nitrozohemoglobina (HbSNO) może również poprzez mechanizm niezależny od cGMP prowadzić do zahamowania agregacji płytek.

Co ciekawe, zmodyfikowana poprzez glikozylację hemoglobina (pochodząca od zwierząt z indukowaną przez streptozocynę cukrzycą) ulega o wiele łatwiej

S-nitrozylacji, a równocześnie trudniej denitrozylacji od hemoglobiny zwierząt kontrolnych [102]. Oznacza to, że glikozylacja hemoglobiny zwiększa powinowactwo i trwałość wiązania NO w reakcji S-nitrozylacji. Może to być jedną z przyczyn uszkodzeń systemu naczyniowego obserwowanych w cukrzycy. Równocześnie zauważono, że S-nitrozylacja patologicznej hemoglobiny S (HbS) zmniejsza tendencje do powstawania polimerów, co z kolei mogłoby mieć znaczenie w terapii anemii sierpowatej [103]. W eksperymentalnie wywołanej endotoksemii następuje wzrost poziomu we krwi zarówno S-nitrozohemoglobiny, jak i S-nitrozoalbuminy [17].

9.2.4. Reakcje S-nitrozylacji białek jako wewnątrzkomórkowe sygnały

Nitrozylacja reszt cysteiny jest obserwowana na bardzo licznych przykładach białek i jest uważana za odwracalny sygnał w biologicznym mechanizmie regulacyjnym komórek (ryc. 11). Poprzez reakcje S-nitrozylacji następuje bezpośrednia aktywacja białek G, takich jak $p21^{ras}$, Rac1 lub Cdc42. Również poprzez S-nitrozylację następuje aktywacja sygnałów komórkowych przez wpływ na aktywność kinaz: ERK, JNK i P38, co jednak najprawdopodobniej następuje dopiero przy obniżonym poziomie GSH [104].

S-nitrozylacja jądrowych czynników transkrypcyjnych NO może również selektywnie regulować transkrypcję genów. Nuklearny czynnik transkrypcyjny ($NF_{\kappa}B$), odpowiedzialny za aktywację genów związanych z odpowiedzią immunologiczną, jest hamowany poprzez reakcję S-nitrozylacji Cys 62 w podjednostce p50 [105]. Następuje to pod wpływem egzogennych donorów NO, takich jak nitroprusydek sodu i w swej konsekwencji uniemożliwia wiązanie się w jądrze $NF_{\kappa}B$ do DNA. Ponieważ znana jest rola czynnika $NF_{\kappa}B$ w replikacji i uaktywnianiu się wirusa HIV [106], dlatego pojawiają się sugestie o możliwości wykorzystania tego w celach terapeutycznych. Również S-nitrozoglutation (GSNO) poprzez wpływ na czynnik transkrypcyjny EGR-1 działa hamująco na proliferację kłębuszkowych komórek mezangialnych [107].

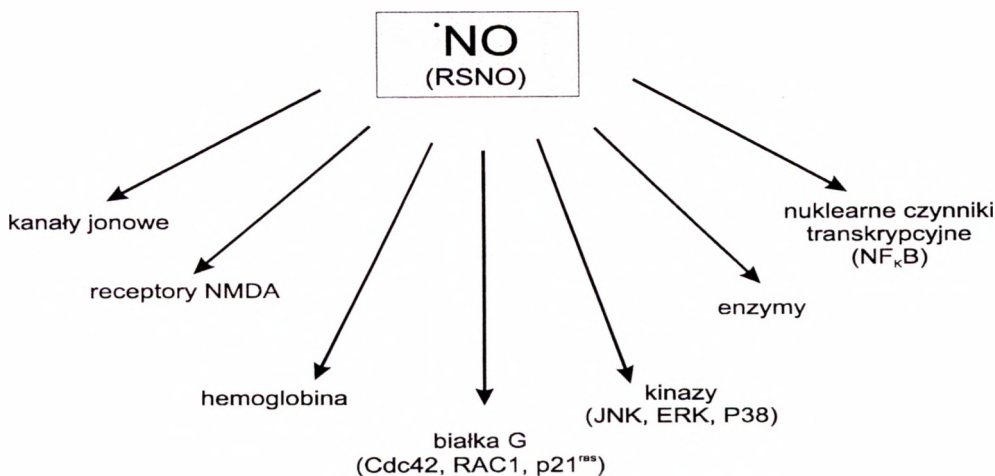
9.2.5. S-nitrozylacja białek kanałów jonowych

Wrażliwymi na tlenek azotu są również liczne kanały, takie jak: kanał receptora NMDA [108], kanał potasowy (K^+) zależny od wapnia (Ca^{+2}) [109], kanał Na^+ w baroreceptorach [110] i kanał receptora rianodyny [93]. Wprawdzie we wszystkich powyższych przykładach postuluje się reakcje S-nitrozylacji, to jednak udział specyficznych reszt cysteiny nie do końca jest udokumentowany. Jedynie w przypadku kanałów cyklicznych nukleotydów stwierdzono, że otwarcie następuje poprzez S-nitrozylację 460 reszty cysteiny w podjednostce α [111, 112]. Ostatnio stwierdzono również udział reakcji S-nitrozylacji w modulacji transportu norepinefryny [113, 114].

9.2.6. Reakcje S-nitrozylacji białek w układzie immunologicznym

Aktywacja układu immunologicznego ustroju zwiększa odporność na choroby infekcyjne, nowotworowe i jest związana z NO powstającym w komórkach układu odpornościowego z udziałem indukowanej syntazy NO. Powstające w tych warunkach pochodne NO wywierają działanie zabójcze na komórki bakteryjne i nowotworowe. Proces ten

jednak czasami może prowadzić również do uszkodzania własnych komórek organizmu. Towarzyszy temu zahamowanie replikacji DNA, oddychania mitochondrialnego czy też pojawienie się synergistycznego działania reaktywnych form azotu (RFA) z reaktywnymi formami tlenu (RFT). Stanami patologicznymi wywoływanymi nadmiarem NO mogą być: wstrząs septyczny, zapalenia, nadciśnienie, zawał i choroby neurodegeneracyjne. W przypadku zespołu nabytego niedoboru odporności (AIDS) nadmierna produkcja NO w komórkach układu immunologicznego odgrywa istotną rolę w uaktywnianiu się wirusa HIV [115, 116]. Z kolei jednak, jak to wykazał w swoich badaniach Persichini [117], S-nitrozylacja 67 i 95 reszty cysteiny prowadzi do inaktywacji proteazy wirusa HIV, co może stanowić istotny mechanizm hamujący replikację wirusa.



Ryc. 11. S-nitrozylacja białek jako niezależne od cGMP drogi transdukcji sygnałów

Reakcje S-nitrozylacji białek mogą być mechanizmami obronnymi organizmu, wspomagającymi obronę przed różnymi patogenami. Gobert i współpracownicy [118] wykazali, że makrofagi w obecności tlenu wykorzystują NO do biosyntezy S-nitrozoalbuminy, która wykazuje możliwość zewnątrzkomórkowego zabijania *Trypanosoma Brucei*. W makrofagach pochodzących od myszy zainfekowanych tym pasożytem obserwuje się podwyższony poziom RFA, który obniża się pod wpływem specyficznych inhibitorów indukowanej syntazy NOS, jak nitro-L-arginina.

9.2.7. S-nitrozylacja białek w procesie apoptozy

Za przyczynę apoptozy przyjmuje się rozregulowanie kaskady transdukcji sygnałów w komórkach pod wpływem nadmiaru reaktywnych form tlenu (RFT). Również tlenek azotu (NO) jest związany z regulacją procesu apoptozy, w czym jest postrzegany głównie jako czynnik proapoptyczny [119]. Ekscytotoksyczne działanie nadmiaru NO uważa się za fundamentalny mechanizm inicjujący apoptozę [120]. Przyjmuje się,

że śmierć apoptyczna komórek jest następstwem wzrostu aktywności indukowanej syntazy NO [120]. Procesowi apoptozy towarzyszy nasilona S-nitrozylacja białek w komórkach, która może być wywołana przez takie SNT, jak: GSNO i SNAP (S-nitrozo-N-acetyloopenicylaminę) [120, 121]. Równocześnie jednak NO w swym fizjologicznym stężeniu może również za sprawą reakcji S-nitrozylacji stać się inhibitorem apoptozy. Kaspazy to rodzina proteaz uważanych za „ostatecznego wykonawcę” różnych sygnałów śmierci. Enzymy te posiadają krytyczną resztę cysteiny (Cys 163 w centrum aktywnym), której S-nitrozylacja prowadzi do zahamowania ich aktywności [122]. Potwierdzają to liczne badania, w których różne egzogenne donory NO poprzez S-nitrozylację kaspazy 3 prowadzą do zahamowania aktywności tego enzymu [123]. Efektem takiej molekularnej modyfikacji kaspazy 3 jest zahamowanie kluczowego sygnału w procesie apoptozy. Reakcja ta może mieć szczególne znaczenie w komórkach śródbłonna naczyń, gdzie jak stwierdzono, NO może pełnić rolę czynnika chroniącego przed apoptozą. Zatem podsumowując, NO w wysokich stężeniach wywołuje efekty proapoptyczne, może jednak również w fizjologicznych stężeniach poprzez S-nitrozylację kaspaz stać się inhibitorem tego procesu. Zatem NO wykazuje możliwość zarówno włączania, jak i wyłączania tego niezwykłego zjawiska biologicznego, jakim jest apoptoza.

9.2.8. S-nitrozylacja jako mechanizm regulacji aktywności enzymów

Nitrozylacja grup –SH może wpływać na aktywność enzymów, co uważa się za jeden z mechanizmów regulacji sygnałów w komórkach. Nasilenie reakcji S-nitrozylacji reszt cysteiny w białkach zawsze towarzyszy stresom peroksydacyjnym i jest związane z nadprodukcją NO w stanach patologicznych, wywołaną wysoką aktywnością indukowalnej syntazy NO [124]. Stwierdzono, że w warunkach stanu zapalnego następuje S-nitrozylacja Cys 232 inhibitora ludzkiej α_1 -proteazy [125]. Dzięki tej kowalencyjnej modyfikacji enzym uzyskuje nową funkcję inhibitora aktywności proteazy tiolowej, w pełni zachowując przy tym aktywność inhibitora proteaz serynowych.

Innym przykładem hamującego wpływu S-nitrozylacji na aktywność enzymów jest S-nitrozylacja reduktazy glutationowej w makrofagach [126]. Następuje to poprzez S-nitrozylację 63 i 58 reszty cysteiny w centrum katalitycznym i prowadzi do niebezpiecznego spadku poziomu zredukowanego GSH i nasilenia się peroksydacyjnych uszkodzeń w komórkach [127]. Będzie to zatem przykład, w którym S-nitrozylacja może prowadzić do patofizjologicznego działania. Z drugiej jednak strony, obniżenie poziomu GSH może powodować spadek biosyntezy NO, ponieważ endogenna biosynteza NO z argininy jest zależna od GSH [128], który jest koniecznym kofaktorem dla syntazy NO [129]. Obserwujemy zatem sytuację, w której aktywacja NOS z udziałem GSH prowadzi do wzrostu poziomu NO, podczas gdy S-nitrozylacja reduktazy glutationowej może obniżać poziom glutationu w makrofagach. Ponadto zahamowanie biosyntezy NO przez inhibitory NOS prowadzi nie tylko do nadciśnienia, ale i do spadku biosyntezy GSH. Następuje to poprzez zahamowanie transkrypcji syntetazy γ -glutamylcysteinowej – enzymu związanego z biosyntezą GSH [130]. Świadczy to o tym, że glutation może na różne sposoby regulować poziom i czas życia NO i jego reaktywnych postaci w komórkach.

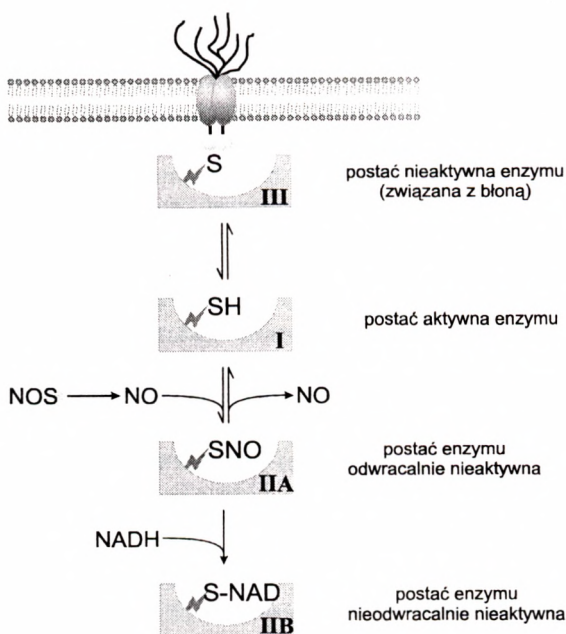
Reakcja S-nitrozylacji 121 reszty cysteiny w cząsteczce syntetazy S-adenozylometioninowej (SAM) stanowi molekularny „wyłącznik” aktywności tego enzymu [131]. Prowadzi to w konsekwencji do zahamowania przemian metioniny w niebezpieczną homocysteinę, a także zahamowanie powstawania cysteiny. Przejściowe zahamowanie aktywności SAM w wyniku interakcji NO z grupami –SH może pełnić protekcyjną rolę w posocznicy, ponieważ prowadzi do zmniejszenia zapotrzebowania na ATP w hepatocytach [132]. Oznacza to, że w warunkach niedotlenienia inaktywacja SAM poprzez S-nitrozylację pozwala zmniejszać zapotrzebowania na ATP. Jednak przedłużone zahamowanie aktywności tego enzymu, co obserwuje się w chronicznych chorobach wątroby, staje się zdecydowanie niekorzystne [132].

Z kolei inaktywacja papainy jest wynikiem reakcji S-transnitrozylacji wysoce reaktywnego jonu tiolanowego (Cys 25) w centrum aktywnym, co ostatecznie prowadzi do powstania mieszanych disiarczków [92]. Poprzez S-nitrozylację następuje także zahamowanie katalitycznej aktywności dehydrogenazy alkoholowej w wątrobie, czemu równocześnie towarzyszy uwolnienie się kationu cynku [133]. Następstwem reakcji S-nitrozylacji jest również zahamowanie pod wpływem niskocząsteczkowych SNT aktywności białkowej fosfatazy tyrozynowej [134].

Coraz większą uwagę jako rodzaj potranslacyjnej modyfikacji białek skupia na sobie proces ADP-rybozylacji. Ten rodzaj kowalencyjnej modulacji białek jest kontrolowany przez NO, w którym donory NO inicjują nieenzymatyczną reakcję S-nitrozylacji umożliwiającą następnie transfer ADP-rybozy. Proces ADP-rybozylacji został najlepiej poznany w przypadku hamowania aktywności dehydrogenazy aldehydu-3-fosfoglicerynowego (DAFG) [135]. Okazuje się, że jedną z przyczyn cytotoksycznego działania NO jest hamowanie dostarczającej energii glikolizy, co następuje poprzez ADP-rybozylację tego enzymu [136, 137, 138]. Według mechanizmu proponowanego przez Galliego i współpracowników [139, 140], w erytrocytach występują trzy formy tego enzymu: postać aktywna z wolną grupą –SH w centrum aktywnym (I), dwie postacie nieaktywne (IIA i IIB) oraz nieaktywna postać III związana z błoną komórkową erytrocytów (ryc. 12). Wzrost poziomu NO na skutek aktywacji NOS i spadek potencjału redukcyjnego komórek faworyzują postać S-nitrozylowaną, która jest odwracalnie nieaktywną (IIA). S-nitrozylacja zarówno inaktywuje enzym, jak i powoduje utratę powinowactwa enzymu do miejsc wiążących w błonie. Poprzez kowalencyjne wiązanie NAD lub NADH, a następnie ADP-rybozylację grupy –SH następuje nieodwracalna inaktywacja enzymu.

Sugeruje się, że S-nitrozylacja 149 reszty cysteiny DAFG, a następnie ADP-rybozylacja jest jednym z mechanizmów zależnego od NO kowalencyjnego wiązania się z NAD [137, 140].

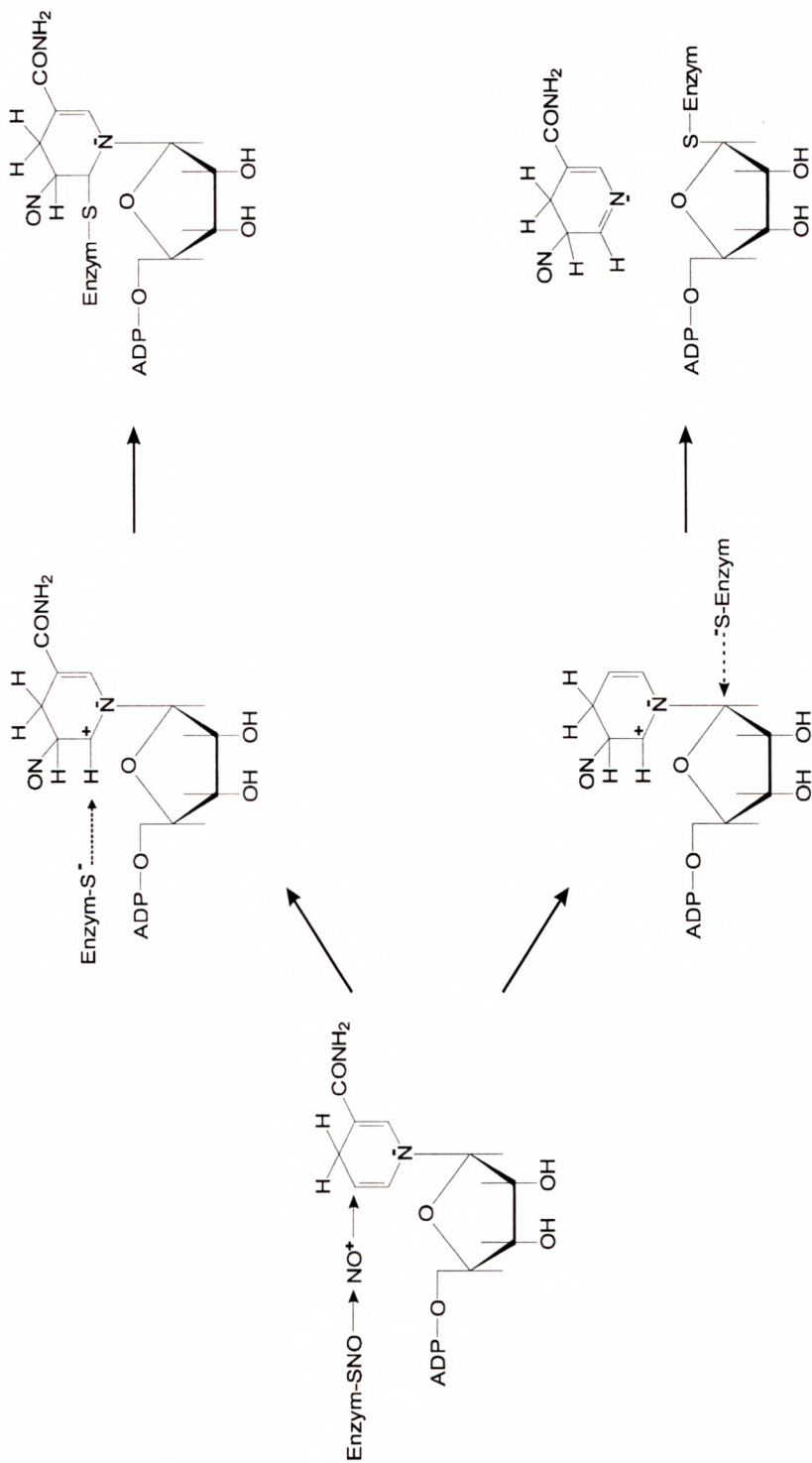




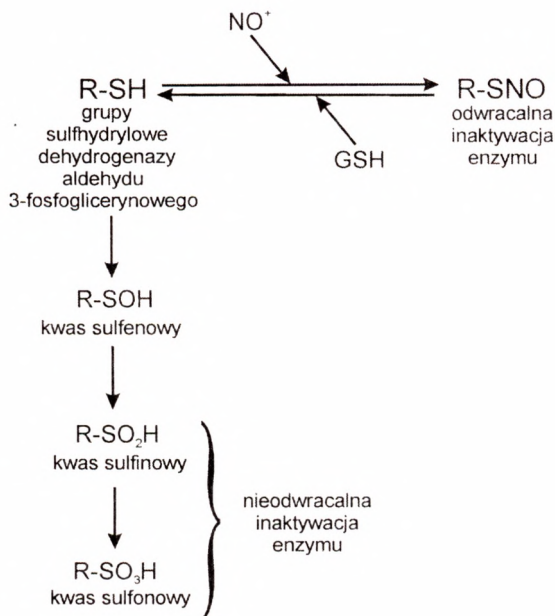
Ryc. 12. Aktywne i nieaktywne postacie dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego erytrocytów (wg Galliego i wsp. [139] zmodyfikowana)

Kolejnym etapem byłaby transnitrozyłacja węgla w pierścieniu koenzymu, co następnie umożliwia atak anionu tiolanowego białka na nukleotyd. W przypadku bliskiej odległości grupy $-SH$ enzymu i miejsca wiążącego NADH nitrozyłacja pierścienia wywołuje wzrost elektrofilności przy węglu 6, co umożliwia atak anionu tiolanowego z powstaniem Enzym-S-NAD (ryc. 13) [141]. Do zależnej od NO ADP-rybozylacji, czyli do powstawania wiązania tioglikozydowego, dochodzi w przypadku, kiedy reszta cysteiny w centrum aktywnym znajduje się bliżej rybozy niż pierścienia nikotynamidowego. Wtedy jon tiolanowy atakuje C1 rybozy, co prowadzi do ADP-rybozylacji grupy $-SH$ i uwolnienia się pierścienia. Poprzez zależną od NO ADP-rybozylację następuje inaktywacja DAFG, co powoduje zahamowanie glikolizy. Zatem proces glikolizy może być inaktywowany przez odpowiednio wysoki poziom NO, co jeszcze bardziej pogłębia niedobór ATP wywołany hamowaniem przez NO łańcucha oddechowego i cyklu Krebsa. W tym przypadku S-nitrozyłacja białka staje się etapem pośrednim na drodze inaktywacji poprzez ADP-rybozylację. S-nitrozyłacja DAFG jest kluczową kowalencyjną modyfikacją, jaka występuje w chronicznym zapaleniu wątroby. Oznacza to, że S-nitrozyłacja białek może prowadzić w tych cząsteczkach do dwóch rodzajów kowalencyjnych modyfikacji, tj. powstawania disiarczków i ADP-rybozylacji grup $-SH$.

Natomiast Ishi i współpracownicy [141] sugerują, że następujące w wyniku S-nitrozyłacji odwracalne zahamowanie aktywności DAFG jest mechanizmem chroniącym przed utlenianiem w warunkach stresu oksydacyjnego grupy $-SH$ centrum katalitycznego do toksycznego kwasu sulfenowego (ryc. 14).



Ryc. 13. Hipotetyczny, zależny od NO mechanizm ADP-rybozylacji dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (DAFG) (wg Mohra i wsp. [140] zmodyfikowana)



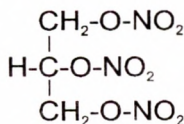
Ryc. 14. Odwracalne i nieodwracalne utlenianie grup $-SH$ w dehydrogenazie aldehydu 3-fosfoglicerynowego

Podsumowując, w chwili obecnej obserwuje się nieustanny wzrost ilości opisanych białek, w stosunku do których stwierdzono, że ulegają *in vivo* i *in vitro* reakcjom S-nitrozylacji. S-nitrozylacja białek jest mechanizmem regulacyjnym o charakterze redokсовym, biorącym udział w procesie transdukcji sygnałów w komórkach. Reakcje S-nitrozylacji białek odgrywają udokumentowaną rolę regulacyjną w procesach odpornościowych organizmu, w kontroli ciśnienia krwi, w procesie krzepnięcia, w regulacji aktywności enzymów i kanałów jonowych, w neurotransmisji i w apoptozie. Reakcje S-nitrozylacji istotnych dla katalizy grup $-SH$ prowadzą do zmian w interakcji enzym-substrat. S-nitrozylacja może również prowadzić w białkach do powstawania zarówno wewnątrzcząsteczkowych lub mieszanych disulfidów, jak i do ADP-rybozylacji białkowych grup $-SH$.

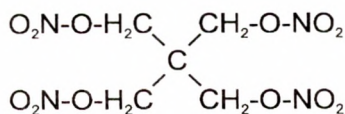
9.3. Udział tioli w biotransformacji organicznych azotanów

9.3.1. Wprowadzenie

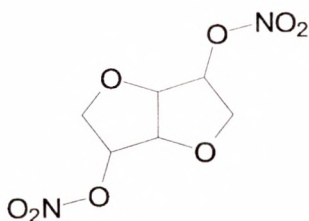
W chwili obecnej ostatecznie zaakceptowano, że śródbłonkowym czynnikiem rozkurczającym (EDRF) na drodze farmakologicznego działania organicznych azotanów jest tlenek azotu NO [2, 3]. Pod wpływem NO następuje aktywacja cykazy guanylowej, co w swej konsekwencji wywołuje rozkurcz mięśni gładkich naczyń oraz antyagregacyjne działanie [2, 4]. Nitrogliceryna (NTG) i inne organiczne azotany są lekami stosowanymi przy niedostatecznej, endogennej biosyntezie NO z arginynej [142] (ryc. 15).



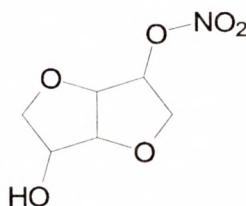
triazotan glicerolu



tetraazotan pentaerytrylu



diazotan izosorbidu



5-monoazotan izosorbidu

Ryc. 15. Organiczne azotany stosowane w terapii przy niedostatecznej endogennej biosyntezie tlenu azotu (NO)

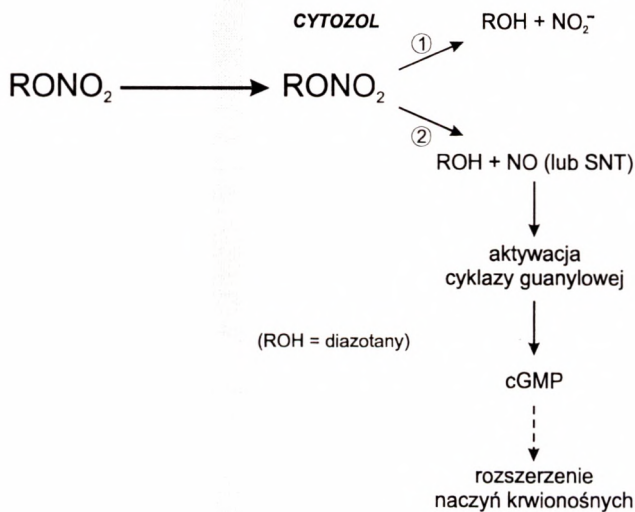
Koniecznym warunkiem ich terapeutycznego działania jest redukcyjna biodegradacja prowadząca do powstawania NO [143]. Jednak poszczególne etapy biotransformacji organicznych azotanów nie do końca zostały poznane. Zauważono, że do bioaktywacji przez organiczne azotany zarówno czystej cykazy guanylowej, jak i obecnej w homogenacie bezwzględnie konieczna jest obecność tioli (np. cysteiny) [144]. Natomiast czynniki utleniające grupy –SH blokują indukowaną przez nitroglicerynę relaksację naczyń [145].

9.3.2. Biodegradacja organicznych azotanów

Inkubacja nitrogliceryny (NTG) *in vitro* z wysokimi stężeniami tioli: cysteiny, N-acetylocysteiny czy kwasu tiosalicylowego prowadzi do spontanicznego, nieenzymatycznego uwalniania NO [146]. W komórkach redukcja nitrogliceryny do NO wydaje się procesem zarówno enzymatycznym, jak i nieenzymatycznym. W uproszczonym schemacie (ryc. 16) przedstawiającym mechanizm biodegradacji organicznych azotanów uważa się, że po przejściu przez błonę komórek śródbłonka następuje: zarówno uwolnienie nieaktywnego jako czynnik relaksacyjny azotynu (NO_2^-), jak i czynnika aktywnego, tj. NO lub pokrewnych mu S-nitrozotiole SNT [143, 147]. Przyjmuje się, że biotransformacja organicznych azotanów w komórkach śródbłonka naczyń przebiega z udziałem: S-transferazy glutationowej (GST) [143, 148, 149] oraz cytochromu P₄₅₀ [150]. Interpretację badań, w których stosowano odpowiednie inhibitory obu enzymów komplikuje jednak fakt, że nieznana jest specyficzność poszczególnych izoenzymów, a także różnorodne działanie samych inhibitorów [148,

149]. Z tych powodów rola powyższych enzymów w procesie biodegradacji organicznych azotanów nie do końca została wyjaśniona. Sugeruje się, że w procesie biodegradacji NTG do NO bierze udział enzym zlokalizowany na powierzchni błony komórkowej z krytyczną dla swej aktywności grupą $-SH$ [151, 152].

Komórka śródbłonna naczyń

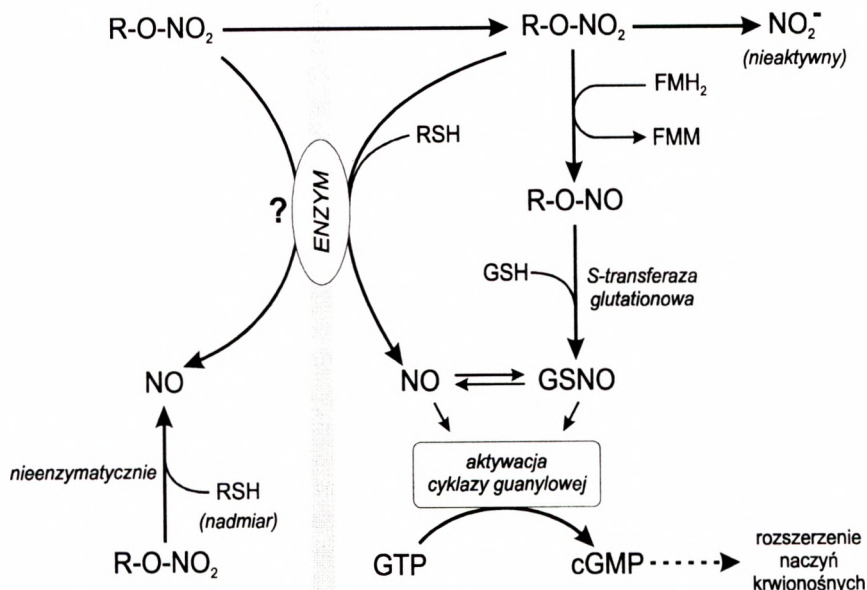


Ryc. 16. Uproszczony schemat biodegradacji organicznych azotanów

Do tej pory nie zostały jednak scharakteryzowane zarówno jego właściwości fizykochemiczne, jak i poznana reakcja chemiczna, którą katalizuje. Zaobserwowano natomiast, że uwalnianie NO z organicznych azotanów wzrasta podczas inkubacji z tiolami, takimi jak cysteina i GSH [144, 145, 146].

Z kolei badania Beosgaarda [153] wskazują, że metabolizm organicznych azotanów przebiega z udziałem enzymu zlokalizowanego w błonie komórek śródbłonna naczyń, w procesie wymagającym nieustannej, wewnątrzkomórkowej biosyntezy glutationu (GSH), a następnie translokacji na zewnątrz komórek. Wong i Fukuto [44] z kolei uważają, że bioaktywacja organicznych azotanów obejmuje współdziałanie flawoprotein i tioli (ryc. 17). Pierwszym etapem tego procesu byłaby redukcja organicznych azotanów z udziałem flawoproteiny do organicznych azotynów ($R-O-NO$). Następnie w reakcji katalizowanej przez S-transferazę glutationową organiczne azotyny byłyby przekształcane do SNT, z których w kolejnych reakcjach enzymatycznych lub nieenzymatycznych byłby uwalniany NO (ryc. 17) [42, 44, 152, 154, 155]. Również Ignarro i współpracownicy [147] uważają, że różne donory NO ulegają przemianom, w których uwalniający się NO jest magazynowany w postaci bardziej stabilnych S-nitrozotioili (SNT), z którymi pozostaje w równowadze.

Komórka śródbłonna naczyń



Ryc. 17. Bioaktywacja organicznych azotanów z udziałem tioli i flawoprotein

Prawdopodobnie, jak to sugeruje Wong [44], kierunek biodegradacji organicznych azotanów w przeważającej części prowadzi do nieaktywnych terapeutycznie metabolitów, a powstawanie takich farmakologicznie aktywnych produktów, jak NO i SNT , ilościowo stanowi tylko mało znaczący tor przemian. Jednak ekstremalnie silne biologiczne działanie NO , jak i SNT czyni z nich leki o niezmiernie ważnym działaniu hipotensyjnym i antyagregacyjnym.

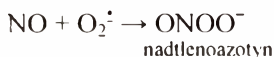
Pomimo że dokładny mechanizm biodegradacji NTG i innych organicznych azotanów nie do końca został poznany, to jednak pozostaje oczywiste, że w procesie tym krytyczną rolę odgrywają tiole [145, 146, 147, 153]. Obserwuje się ponadto, że niezależnie od aktywacji cykazy guanylowej, co następuje w wyniku koordynacyjnego wiązania NO z hemem [1, 2, 146], możliwy jest również wpływ na poziom $cGMP$ poprzez aktywację grupy $-SH$ cykazy guanylowej [156].

Obserwowana konieczna obecność tioli zarówno w przemianach organicznych azotanów, jak i dla biologicznej roli samego NO może być związana z funkcją kofaktorów, jak i czynników zapewniających redukujące warunki środowiska. Oznacza to, że tiole wpływają zarówno na metabolizm organicznych azotanów, jak i na stabilność i równowagę pomiędzy poszczególnymi postaciami redoksowymi NO , jakie występują w komórkach [157, 159].

9.3.3. Tiole a zjawisko tolerancji na organiczne azotany

Niepożądaną stroną terapii organicznymi azotanami jest pojawianie się zjawiska hemodynamicznej tolerancji [89, 158]. Wskutek tego dalsze podawanie nitrogliceryny lub innych organicznych azotanów już nie prowadzi do wymaganego efektu terapeutycznego. Oznacza to, że przedłużone podawanie zmniejsza skuteczność działania, ponieważ spada ilość powstającego NO. Pod wpływem NTG obserwuje się ponadto tzw. tolerancję krzyżową, to znaczy objawiającą się również w stosunku do innych organicznych azotanów [160], jak i w stosunku do S-nitrozoaspiryny [161]. Za jedną z przyczyn pojawiania się zjawiska tolerancji uważa się zaburzenia w procesie biotransformacji organicznych azotanów do NO lub SNT [161, 162]. Zaobserwowano, że ze zjawiskiem tym łączy się spadek poziomu tioli, tj. cysteiny i glutationu w komórkach śródbłonna naczyń [157]. Dlatego też Needleman [163] jako pierwszy wprowadził tzw. teorię *thiol depletion*, według której za przyczynę tolerancji w stosunku do organicznych azotanów uważa się obniżony poziom tioli. Oznacza to, że niedobór tioli miałby prowadzić do zaburzonej biodegradacji organicznych azotanów i spadku poziomu uwalnianego NO. Potwierdzeniem tej teorii miał być fakt, że związki tiolowe, takie jak tiolowy lek i prekursor cysteiny – N-acetylocysteina (NAC), skutecznie „znosily” tolerancję [158, 159]. Okazało się jednak, że argument ten na rzecz poparcia teorii *thiol depletion* jest niewystarczający [153, 164]. Zauważono bowiem, że NAC, po pierwsze, nie znosi całkowicie wszystkich hemodynamicznych zmian w działaniu organicznych azotanów, a po drugie, prowadzi do zwiększenia farmakologicznego działania NTG nawet wtedy, kiedy jeszcze nie doszło do zjawiska tolerancji [153, 164, 165]. Oznacza to, że NAC wykazuje możliwość zwiększenia skuteczności działania NTG zarówno u zwierząt z tolerancją, jak i bez tolerancji. Poważne wyzwanie teorii Needlemana [163] rzuciły również spostrzeżenia, że zwierzęta z tolerancją na NTG inaczej reagują na „prekursory” cysteiny w porównaniu ze zwierzętami bez tolerancji. Okazało się, że pod wpływem prekursora cysteiny kwasu 2-oksotiazolidyno-4-karboksylowego w komórkach aorty zwierząt bez tolerancji następuje wzrost poziomu cysteiny i GSH [166], podobnie jak to obserwuje się w wątrobie [167]. Natomiast efektu takiego nie stwierdzano u zwierząt, u których już nastąpiła tolerancja [157]. Oznacza to, że pojawieniu się zjawiska tolerancji mogą towarzyszyć znaczące zmiany w aktywnościach enzymów związanych z metabolizmem cysteiny i GSH. Towarzyszący tolerancji spadek poziomu GSH może być efektem wzmoczonej biodegradacji NTG z udziałem S-transferazy glutationowej, w której GSH jako kofaktor ulega przekształceniu do odpowiednich S-koniugatów (tioeterów) [149, 150]. Nie można również wykluczyć reakcji utleniania GSH do disiarczku w wyniku nasilenia procesów peroksydacyjnych. Zatem w sytuacji nasilonego zapotrzebowania i wykorzystywania tioli, jaka towarzyszy wywoływanej przez NTG tolerancji, podawanie prekursorów cysteiny nie powoduje znaczącego wzrostu poziomu GSH i cysteiny. Oznacza to, że zjawisku temu może towarzyszyć nasilenie przemian tioli, to jest cysteiny i GSH. Dlatego zgodnie z sugestiami Boesgaarda [157] efektem tolerancji na organiczne azotany jest raczej zakłócona homeostaza tioli w komórkach śródbłonna naczyń. Natomiast teoria *thiol depletion* wydaje się w chwili obecnej nieadekwatna dla pełnego wyjaśnienia tego zjawiska.

Równocześnie obserwuje się, że tolerancji towarzyszy wzrost poziomu reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach śródbłonna naczyń – głównie anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$) [168, 169]. Pojawiły się także spostrzeżenia, że podawanie będących antyoksydantami witamin C i E zapobiega tolerancji i utrzymuje rozkurczowe działanie organicznych azotanów [170, 171]. Dlatego coraz częściej próbuje się tłumaczyć to zjawisko wzmocnionym wytwarzaniem w komórkach śródbłonna anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$). Wzrost bowiem stężenia $O_2^{\cdot-}$ prowadzi do reakcji z NO z powstaniem nadtlenoazotynu ($ONOO^-$), co oznacza biologiczną inaktywację NO [6, 22].

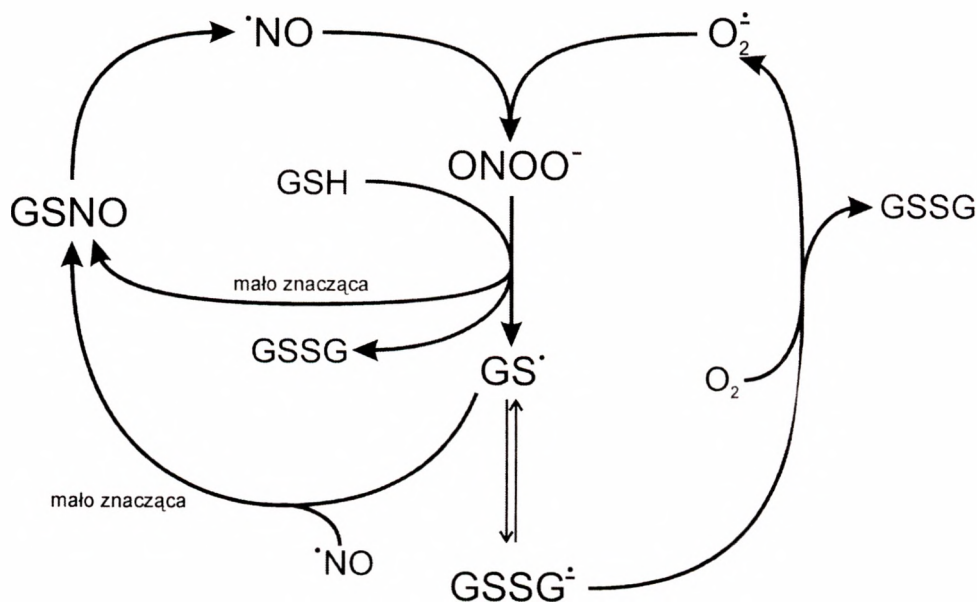


Przebieg reakcji NO z $O_2^{\cdot-}$ jest wprawdzie bardzo ograniczony w fazie gazowej, to jest jednak ekstremalnie szybki w fazie wodnej [22]. Zatem towarzysząca biodegradacji NTG nadprodukcja $O_2^{\cdot-}$ może prowadzić do „wyłapywania” NO i do pojawienia się tolerancji na skutek spadku poziomu NO, w konsekwencji cGMP. Nie do końca pozostają wyjaśnione przyczyny wzmoczonej produkcji $O_2^{\cdot-}$ pod wpływem podawania organicznych azotanów. Prawdopodobnie może to być wynik obniżenia poziomu glutationu i związanego z tym osłabienia obrony antyoksydacyjnej komórek. Przyczyną tego może być również zwiększona aktywność oksydazy NADPH – enzymu generującego powstawanie $O_2^{\cdot-}$. [172]. Zatem przedłużonemu podawaniu organicznych azotanów towarzyszy spadek NO przy równoczesnym wzroście poziomu nadtlenoazotynu ($ONOO^-$). Ta wysoce reaktywna cząsteczka wywołuje cytotoksyczność poprzez utlenianie grup $-SH$ w komórkach [22, 23, 173]. Następuje to z powstawaniem niebezpiecznego rodnika tiyłowego $-S^{\cdot}$, co może prowadzić do dodatkowego generowania $O_2^{\cdot-}$ (ryc. 18) i w efekcie dalszego obniżania poziomu GSH i NO w komórkach [22, 23, 38, 173, 174]. W konsekwencji oznacza to zaburzenie potencjału oksydacyjno-redukcyjnego komórek, osłabienie obrony antyoksydacyjnej, jak również zaburzenie fizjologicznej równowagi pomiędzy różnymi postaciami redoksoowymi NO. Zatem towarzyszące podawaniu organicznych azotanów nadmierne powstawanie $O_2^{\cdot-}$ powoduje spadek poziomu NO, spadek poziomu tioli oraz wzrost stężenia wysoce toksycznego $ONOO^-$ [22, 174]. Wskutek tego w komórkach śródbłonna naczyń następuje obniżenie poziomu cGMP i osłabienie działania rozkurczowego NTG i innych organicznych azotanów.

Okazuje się, że straty w stężeniu NO, jakie mogą się ujawniać w komórkach w wyniku wzmoczonego stresu oksydacyjnego, wynikają nie tylko z reakcji NO z $O_2^{\cdot-}$, ale także z reakcji NO z różnymi pośrednimi produktami peroksydacji lipidów [175]. Procesy te jednak z drugiej strony można uważać za chroniące komórki przed toksycznymi aldehydami, końcowymi produktami peroksydacji lipidów [176].

Udział RFT w pojawianiu się zjawiska tolerancji potwierdzają również badania, w których wykazano, że pod wpływem NTG następuje zarówno w izolowanych komórkach śródbłonna, jak i w pełnej krwi 200% wzrost poziomu RFT [168]. Natomiast w tych samych warunkach pod wpływem innego leku – będącego prekursorem NO, tj. tetraazotanu pentaerytrylu (PETN), poziom RFT wzrasta tylko o 20% [168]. Tak znacząco słabsze działanie prooksydacyjne PETN w stosunku do NTG okazało się związane z antyoksydacyjnymi właściwościami powstającego pośredniego metabolitu, tj.

diazotanu pentaerytrylu. Dlatego w konsekwencji PETN w porównaniu z NTG wywołuje zmniejszone generowanie RFT, a co za tym idzie także mniejszą tolerancję.



Ryc. 18. Hipotetyczny udział nadutlenoazotynu (ONOO⁻) w toksyczności tlenku azotu (NO)

Jeżeli chodzi o sam NO, to w zależności od warunków środowiska może wykazywać zarówno działanie prooksydacyjne, jak i antyoksydacyjne [1, 177]. NO poprzez możliwość wiązania jonów metali biorących udział w reakcji Fentona, jak również poprzez możliwość reagowania z RFT wykazuje cechy osłaniające [173]. Z drugiej jednak strony, NO w obecności O₂^{•-}, tlenu i innych RFT może ulegać przekształceniu w tak silny oksydant, jak ONOO⁻ czy NO₂, co prowadzi do nasilenia się peroksydacyjnych uszkodzeń [23, 174].

Nadutlenoazotyn (ONOO⁻) jako czynnik silnie nitrozylujący prowadzi także do wzrostu poziomu 3-nitrotyrozyny, której poziom, jak się przyjmuje, odzwierciedla natężenie powstawania ONOO⁻ w komórkach [178, 179]. Okazuje się, że u zwierząt z tolerancją na NTG antyoksydanty, takie jak NAC i melatonina, znacząco obniżają poziom nitrotyrozyny, co potwierdza, że zjawisko to jest związane z nadmiernym powstawaniem ONOO⁻ [180]. Innym dowodem wskazującym na to, że tolerancja na nitroglicerynę jest związana z nasilonym powstawaniem RFT i wzmożoną peroksydacją lipidów, jest obserwowany w komórkach wzrost poziomu dialdehydu malonowego (MDA) [180].

Nadprodukcję O₂^{•-} z równoczesnym obniżeniem poziomu antyoksydantów obserwuje się w stanach patologicznych, takich jak nadciśnienie [180, 181], a także cukrzyca [182, 183]. Dlatego występujący u tych pacjentów wzrost poziomu RFT w komórkach śródbłonna naczyń będzie szybciej niż u osób zdrowych prowadzić do

spadku skuteczności terapeutycznego działania NTG. W związku z tym podawaniu organicznych azotanów w tych stanach chorobowych powinno towarzyszyć podawanie antyoksydantów [184].

Towarzyszący tolerancji wzrost poziomu ONOO^- może dodatkowo prowadzić do nasilenia tego zjawiska poprzez utlenianie krytycznych dla aktywności cykazy guanylowej grup $-\text{SH}$ [185].

Prekursor cysteiny kwas 2-oksotiazolidyno-4-karboksyłowy ulega w komórkach enzymatycznej przemianie do cysteiny i dzięki temu może wewnątrzkomórkowo zwiększać poziom tego aminokwasu i GSH [167]. Związek ten jednak w odróżnieniu do NAC nie powodował zwiększenia hipotensyjnego działania NTG [166]. Oznacza to, że wewnątrzkomórkowy wzrost poziomu cysteiny nie wpływa na biodegradację NTG do NO. Obserwacje te zatem sugerują, że aktywujący wpływ na farmakologiczne działanie NTG innego prekursora cysteiny, tj. NAC, może być spowodowany zewnątrzkomórkowym działaniem tego leku [186, 187]. W fizjologicznych warunkach poziom tioli w osoczu (cysteiny, GSH) jest bardzo niski, zatem wszelka „manipulacja” pozakomórkowymi stężeniami tioli może mieć znaczne konsekwencje farmakologiczne. Wiadomo również, że w płynie śródmiąższowym, tj. w środowisku bezpośrednio otaczającym komórki śródbłonna, poziom tioli jest znacznie wyższy niż w osoczu [187]. Zatem wzrost zewnątrzkomórkowego poziomu tioli przez podawanie NAC mógłby „imitować” sytuację, jaka w fizjologicznych warunkach występuje w środowisku bezpośrednio otaczającym komórki śródbłonna naczyń. Obserwacje te potwierdzają hipotezę Boesgaarda [157], według której biodegradacja organicznych azotanów może być związana zarówno z wewnątrzkomórkowymi, jak i z pozakomórkowymi tiolami. Umożliwia to również pogodzenie większości opublikowanych i często rozbieżnych informacji na temat interakcji tiol-organiczne azotany.

Farmakologiczne działanie NTG jako egzogenego donora NO i promotora zależnego od cGMP rozkurczu naczyń zależy z całą pewnością od statusu redokсового tioli w komórkach. Będzie zatem zależeć od specyficznej równowagi pomiędzy stężeniami powstających z NTG, NO i SNT, jak również stymulowanym przez NTG powstawaniem $\text{O}_2^{\cdot -}$ i ONOO^- oraz stężeniem tioli w komórkach. Tiole jako antyoksydanty mogą obniżać poziom $\text{O}_2^{\cdot -}$, mogą również w postaci SNT magazynować NO i na tej drodze chronić komórki przed powstawaniem toksycznego ONOO^- [42, 50, 58].

Zatem jeżeli początkowo uważano obniżenie poziomu tioli w komórkach naczyniowych za czynnik odpowiedzialny za pojawienie się tolerancji na organiczne azotany [163], to obecnie przyjmuje się, że tolerancja jest raczej konsekwencją zakłócenia homeostazy tioli [157, 165]. Ostatecznie należy przyjąć, że spadek poziomu tioli na pewno nie jest przyczyną tolerancji, to jednak z całą pewnością zjawisku temu towarzyszy, oraz że egzogenne tiole mogą przywracać terapeutyczne działanie NTG. Z obserwacji tych wynikają ważne implikacje kliniczne, wskazujące, że podawanie tiolowych leków, jak również antyoksydantów może w istotny sposób wpływać na skuteczność farmakologicznego działania organicznych azotanów.

Wyniki licznych badań wskazują, że pojawieniu się tolerancji na NTG równocześnie towarzyszy aktywacja systemu renina-angiotensyna i wzrost poziomu krążącej angiotensyny II [188]. Ponieważ tiole, takie jak NAC, hamują konwertazę (ACE) – enzym przekształcający angiotensynę, oznacza to, że związki te mogą również na tej drodze przeciwdziałać pojawianiu się tolerancji na organiczne azotany [189]. Pod

wpływem tioli może zatem następować równocześnie stymulacja biodegradacji organicznych azotanów do NO, jak i osłabienie indukowanej przez organiczne azotany stymulacji systemu renina–angiotensyna. Z udziałem tioli możliwe jest również magazynowanie i transport NO w postaci stabilnych S-nitrozotiole SNT [10, 42, 58]. Dlatego z tych wszystkich powodów równoczesne podawanie organicznych azotanów i tioli może prowadzić do polepszenia skuteczności terapeutycznego działania donorów NO. U ludzi stwierdzono, że równoległe podawanie NAC i NTG odwraca częściowo tolerancję na azotany i zwiększa efekt hipotensyjnego działania [186]. Zatem tiole mogą stać się użytecznymi lekami pomocniczymi w terapii organicznymi azotanami. Jednak kliniczne stosowanie NAC jest ograniczone z powodu często występującej nietolerancji przewodu pokarmowego. Dlatego dalsze badania powinny się koncentrować na poszukiwaniu nowych, skuteczniejszych i równocześnie niewykazujących ubocznego działania związków tiolowych. Na przykład, badania prowadzone na skrawkach aorty szczurów z tolerancją wykazały, że skuteczniejszym tiolem od NAC w przywracaniu relaksacyjnego działania NTG jest kwas tiosalicylowy [146]. Ponieważ tiole są związkami o antyoksydacyjnym działaniu, wskazane jest również prowadzenie badań nad zapewnieniem tolerancji pod wpływem antyoksydantów niebędących tiolami.

Ze względów terapeutycznych potencjalnie istnieją następujące strategie pozwalające przezwyciężać utrudniające leczenie zjawisko tolerancji i w tych kierunkach powinny być również prowadzone dalsze badania [190]:

- wprowadzenie okresów wolnych od podawania organicznych azotanów i zastępowania ich w tym czasie lekami niewywołującymi tolerancji, takimi jak molso-dimina lub SNT [77, 191]; co ciekawe, SNT zachowują biologiczną aktywność nawet w przypadkach, kiedy już wcześniej wystąpiła tolerancja [77];
- istnieje również możliwość stosowania wzrastających dawek nitrogliceryny [192], do ustalenia pozostaje jednak, jak dalece można ten sposób stosować;
- wskazane jest także równoczesne podawanie z organicznymi azotanami – inhibitorów enzymu przekształcającego angiotensynę (ACE) [193], a także witamin o działaniu antyoksydacyjnym (C i E) [194];
- skutecznym sposobem w zapobieganiu tolerancji może okazać się również równoczesne podawanie substratu dla syntazy NO, tj. argininy [195];
- potencjalnie duże możliwości mogą kryć się we współdziałaniu NTG ze związkami tiolowymi [12, 34, 196], dlatego szczególnie na tym ostatnim kierunku powinny koncentrować się dalsze poszukiwania mające na celu zapobieganie tolerancji.

Dla pełnego wyjaśnienia zjawiska tolerancji na organiczne azotany konieczne wydają się także badania pozwalające poznać rolę SNT w tym procesie [77]. Do wyjaśnienia pozostaje również, w jakim stopniu tiolowy lek – kaptopril, będący inhibitorem ACE, może także jako związek tiolowy wywierać wpływ na hipotensyjne działanie NTG. Jest to tym bardziej interesujące, że, jak się okazuje, S-nitrozokaptopril może pełnić podwójną rolę, zarówno inhibitora konwertazy (ACE), jak i donora NO [197].

Literatura

- [1] Zdzińska B., Kandefer-Szerszeń M. (1998), *Rola tlenu azotu w prawidłowych i patologicznych reakcjach odpornościowych*. Post. Hig. Med. Dośw., 52, 621–636.
- [2] Zabłocka A. (1999), *Tlenek azotu – metabolizm, funkcje i właściwości biologiczne*. Post. Hig. Med. Dośw., 53, 785–796.
- [3] Kelm M. (1999), *Nitric-oxide metabolism and breakdown*. Biochim. Biophys. Acta, 1411, 273–289.
- [4] Stamler J.S. (1994), *Redox signaling: Nitrosylation and related target interactions of nitric oxide*. Cell, 78, 931–936.
- [5] Hogg N. (2000), *Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols*. Free Rad. Biol. Med., 28, 1478–1486.
- [6] Hughes M.N. (1999), *Relationships between nitric oxide, nitroxyl ion, nitrosonium cation and peroxyxynitrite*. Biochim. Biophys. Acta, 1411, 263–272.
- [7] Castellani A.G., Niven C.F. (1955), *Factors affecting the bacteriostatic action of sodium nitrite*. Appl. Microbiol., 3, 154–159.
- [8] Ignarro L.J., Grueter C.A. (1980), *Requirement of thiols for activation of coronary arterial guanylate cyclase by glycerol trinitrite and sodium nitrite*. Biochim. Biophys. Acta, 63, 221–231.
- [9] Stamler J.S. (1995), *S-nitrothiols and the bioregulatory actions of nitrogen oxides through reactions with thiol groups*. W: *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Eds. Koprowski H. and Maeda H., 196, 19–30.
- [10] Shen F.S., Zhu W., Fung P.C. (2000), *Direct observation of trapping and release of nitric oxide by glutathione and cysteine with electron paramagnetic resonance spectroscopy*. Biophys. J., 78, 1216–1226.
- [11] Hogg N. (1999), *The kinetics of S-transnitrosation – A reversible second-order reaction*. Anal. Biochem., 272, 257–262.
- [12] Gaston B. (1999), *Nitric oxide and thiol groups*. Biochim. Biophys. Acta, 1411, 323–333.
- [13] Tsikas D., Sandmann J., Rossa S., Gutzki F.M., Frölich J.C. (1999), *Investigations of S-transnitrosylation reactions between low and high-molecular weight S-nitroso compounds and their thiols by high-performance liquid chromatography and gas chromatography – mass spectrometry*. Anal. Biochem., 270, 231–241.
- [14] Kharitonov V.G., Sundquist A.R., Sharma V.S. (1995), *Kinetics of nitrosation of thiols by nitric oxide in the presence of oxygen*. J. Biol. Chem., 270, 28158–28164.
- [15] Wink D., Darbyshire J., Mims R., Savadra J., Ford P. (1993), *Reactions of the bioregulatory agent nitric oxide in oxygenated aqueous media: determination of the kinetics for oxidation and nitrosation by intermediates generated in the NO/O₂ reaction*. Chem. Res. Toxicol., 6, 17–23.
- [16] Gobert A., Vincendeau P., Mossalayi D., Veyret B. (1999), *Mechanism of extracellular thiol nitrosylation by N₂O₃ produced by activated macrophages*. Nitric Oxide, 3, 467–472.
- [17] Yourd’heul D., Hallen K., Feelisch M., Grisham M.B. (2000), *Dynamic state of S-nitrosothiols in human plasma and whole blood*. Free Rad. Biol. Med., 28, 409–417.
- [18] Scharfstein J.S., Keaney J.F., Slivka A., Welch G.N., Vita J.A., Stamler J.S., Lascalo J. (1994), *In vivo transfer of nitric oxide between a plasma protein bound reservoir and low molecular weight thiols*. J. Clin. Invest., 94, 1432–1439.
- [19] Gow A.J., Buerk D.G., Ischiropoulos H. (1997), *A novel reaction mechanism for the formation of S-nitrosothiol in vivo*. J. Biol. Chem., 272, 2841–2845.
- [20] Halliwell B., Zhaok K., Whiteman M. (1999), *Nitric oxide and peroxyxynitrite*. Free Rad. Res., 31, 651–669.

- [21] Vinten-Johansen J. (2000). *Physiological effects of peroxynitrite: potential effects of the environment*. *Circul. Res.*, 87, 170–172.
- [22] Pryor W.A., Squadrito G.L. (1995). *The chemistry of peroxynitrite a product from the reaction of nitric oxide with superoxide*. *Am. J. Physiol.*, 268, L699–L722.
- [23] Karoui H., Hogg N., Frejavilles C., Torda P., Kalyanaraman B. (1996). *Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during oxidation of thiols and sulfite by peroxynitrite*. *J. Biol. Chem.*, 271, 6000–6009.
- [24] Yeales R.A., Laufen H., Leitzold M. (1985). *The reaction between organic nitrates and sulphhydryl compounds: a possible model system for the activation of organic nitrates*. *Mol. Pharmacol.*, 28, 555–559.
- [25] Inoue K., Akaike T., Miyamoto Y., Okamoto T., Sawa T., Otagiru M., Suzuki S., Yoshimura T., Maeda H. (1999). *Nitrosothiol formation catalyzed by ceruloplasmin*. *J. Biol. Chem.*, 274, 27069–27075.
- [26] Stubauer G., Ginfrije A., Sarti P. (1999). *Mechanism of S-nitrosothiol formation and degradation mediated by copper ions*. *J. Biol. Chem.*, 274, 28128–28133.
- [27] Hirayama A., Naronha-Dutra A.A., Gordge M.P., Neidl G.H., Hothersal J.S. (1999). *S-nitrosothiols are stored by platelets and released during platelet-neutrophil interaction*. *Nitric Oxide*, 3, 95–104.
- [28] Broillet M.C. (1999). *S-nitrosylation of protein*. *Cell. Med. Life Sc.*, 55, 1036–1042.
- [29] Kashiba M., Kasahara E., Chien K.C., Inoue M. (1999). *Fates and vascular action of S-nitrosoglutathione and related compounds in the circulation*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 363, 213–218.
- [30] Gordge M.P., Addis P., Noronha-Dutra A.A., Hothersall J.S. (1998). *Cell-mediated biotransformation of S-nitrosoglutathione*. *Biochem. Pharmacol.*, 55, 657–665.
- [31] Langford E.J., Brown A.S., Wainwright R.J., de Belder A.J., Thomas M.R., Smith R.E.A., Radomski M.W., Martin J.F., Moncada S. (1994). *Inhibition of platelet activity by S-nitrosoglutathione during coronary angioplasty*. *Lancet*, 344, 1458–1460.
- [32] Upchurch G.R., Welch G.N., Loscalzo J. (1996). *The vascular biology of S-nitrosothiols, nitrosated derivatives of thiols*. *Vascular Med.*, 1, 25–33.
- [33] Arnelle D.R., Stamler J.S. (1995). *NO[•], NO and NO⁻ donation by S-nitrosothiols: implication for regulation of physiological function by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 318, 279–285.
- [34] Ellis A., Li C.G., Romd M.J. (2000). *Differential actions of L-cysteine on responses to nitric oxide nitroxyl anions and EDRF in rat aorta*. *Br. J. Pharmacol.*, 129, 315–322.
- [35] Wolz M., Mac Allister R.J., Davis D., Feelisch M., Moncada S., Vallane P., Hobbs A.J. (1999). *Biochemical characterization of S-nitrosohemoglobin*. *J. Biol. Chem.*, 274, 28983–28990.
- [36] Le M., Zhang H., Means G.H. (1997). *The decomposition of S-nitrosated dithiols: A model for vicinal nitrosothiols in enzymes*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 7, 1393–1398.
- [37] Klatt P., Lamas S. (2000). *Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress*. *Eur. J. Biochem.*, 267, 4928–4944.
- [38] De Master E.G., Quast B.J., Redfern B., Nagasawa H.T. (1995). *Reaction of nitric oxide with the free sulphhydryl group of human serum albumin yields a sulfene acid and nitrous oxide*. *Biochemistry*, 34, 11494–11499.
- [39] Claiborne A., Yeh J.J., Mallet C.T., Luba J., Crane E.J., Charrier V., Parsonage D. (1999). *Protein-sulfenic acids diverse roles for an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation*. *Biochemistry*, 38, 15407–15416.
- [40] Lenartowicz E., Wudarczyk J., Dębska G. (1996). *Regulacja stopnia oksydoredukcji grup tiolowych w komórkach zwierzęcych*. *Postępy Biochemii*, 42, 154–160.
- [41] Megson J.L., Flitney F.W., Bates J., Webster R. (1995). *Repriming of vascular smooth muscle photorelaxation is depend upon endothelium nitric oxide*. *Endothelium*, 3, 39–46.

- [42] Al-Sa'doni M., Ferro A. (2000), *S-nitrosothiols: a class of nitric oxide-donor drugs*. Clin. Sc., 98, 507–520.
- [43] Venturini C.M., Palmer R.M., Moncada S. (1993), *Vascular smooth muscle contains a depletable store of a vasodilator which is light-activated and restored by donors of nitric oxide*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 266, 1497–1500.
- [44] Wong P.S., Fukuto J.M. (1999), *Reaction of organic nitrate esters and S-nitrosothiols with reduced flavins: A possible mechanism of bioactivation*. Drug. Metab. Dispos., 27, 502–509.
- [45] Stamler J.S., Jaraki O., Osborne J., Simon D.J., Keaney J. (1992), *Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin*. Proc. Natl. Acad. Sc. USA, 89, 7674–7677.
- [46] Bouton C. (1999), *Nitrosative and oxidative modulation of iron regulatory proteins*. Cell. Med. Life Sc., 55, 1043–1053.
- [47] Gordge M.P., Meyer D.J., Hotherhall J., Neidhl G.H., Payne N.N., Noronha-Dutra A. (1995), *Copper chelation-induced reduction of the biological activity of S-nitrosothiols*. Br. J. Pharmacol., 114, 1083–1089.
- [48] Gorren A.C.F., Schrammel A., Schmidt K., Mayer B. (1996), *Decomposition of S-nitrosoglutathione in the presence of copper ions and glutathione*. Arch. Biochem. Biophys., 330, 219–228.
- [49] Stamler G., Giuffrije A., Sarti P. (1999), *Mechanism of S-nitrosothiol formation and degradation mediated by copper ions*. J. Biol. Chem., 274, 28128–28133.
- [50] Smith J.N., Dasgupta T.P. (2000), *Kinetics and mechanism of the decomposition of S-nitrosoglutathione by L-ascorbic acid and copper ions in aqueous solution to produce nitric oxide*. Nitric Oxide, 4 (1), 57–66.
- [51] Scorza G., Putraforte D., Minetti M. (1997), *Role of ascorbate and protein thiols in the release of nitric oxide from S-nitroso-albumin and S-nitroso-glutathione in human plasma*. Free Rad. Biol. Med., 22, 633–642.
- [52] De Man J.G., Moreels T.G., De Winter Y., Herman A.G. (1999), *Neocupreine potentiates the activity of the nitric neurotransmitter but inhibits that of the S-nitrosothiols*. Eur. J. Pharmacol., 381, 151–159.
- [53] Holmes A.J., Williams D.L.H. (2000), *Reaction of ascorbic acid with S-nitrosothiols: clear evidence for two distinct reaction pathways*. J. Chem. Soc. Perkin. Trans., 2, 1639–1644.
- [54] Munro A.P., Williams D.L.H. (1999), *Reactivity of nitrogen, nucleophiles towards S-nitrosopenicillamine*. J. Chem. Soc. Perkin Trans., 2, 1989–1993.
- [55] Munro A., Williams D.L. (2000), *Reactivity of sulphur nucleophiles towards S-nitrosothiols*. J. Chem. Soc. Perkin. Trans., 2, 1794–1797.
- [56] Jour'dheuil D., Mai C.T., Laroux F.S., Wink D.A., Grisham M.B. (1998), *The reaction of S-nitrosoglutathione with superoxide*. Biochem. Biophys. Res. Comm., 244, 525–530.
- [57] Jour'dheuil D., Laroux F.S., Miles A.M., Wink D.A., Grisham M.B. (1999), *Effect of superoxide dismutase on the stability of S-nitrosothiols*. Arch. Biochem. Biophys., 361, 323–330.
- [58] Jour'dheuil D., Gray L., Grisham M.B. (2000), *S-nitrosothiol formation in blood of lipopolysaccharide-treated rats*. Biochem. Biophys. Res. Comm., 273, 22–26.
- [59] Singh R.J., Hogg N., Joseph J., Kalyanaraman B. (1996), *Mechanism of nitrate oxide release from S-nitrosothiols*. J. Biol. Chem., 271, 18596–18603.
- [60] Kostka P., Xu B., Skiles E.H. (1999), *Degradation of S-nitrosocysteine in vascular tissues homogenates: Role of divalent ions*. J. Cardiovasc. Pharmacol., 33, 665–670.
- [61] Nikitovic D., Holmgren A. (1996), *S-nitrosoglutathione is cleaved by the thioredoxin system with liberation of glutathione and redox regulating nitric oxide*. J. Biol. Chem. 271, 19180–19185.
- [62] Hau Y., Gug Z., Li J., Wang P.G. (1996), *Selenocompounds and glutathione peroxidase catalyzed decomposition of S-nitrosothiols*. Biochem. Biophys. Res. Comm., 228, 88–93.

- [63] Truyillo M., Alvarez M.N., Paluffo G., Freeman B.A. (1998), *Xantine oxidase-mediated decomposition of S-nitrosothiols*. J. Biol. Chem., 273, 7828–7834.
- [64] Hogg N., Singh R.J., Konorev E., Joseph J., Kahjanaraman B. (1997), *S-nitrosoglutathione as a substrat for γ -glutamyl transpeptidase*. Biochem. J., 323, 477–481.
- [65] Hinchman C., Ballatori N. (1990), *Glutathione degradating capacities of liver and kidney in different species*. Biochem. Pharmacol., 40, 31–36.
- [66] Garcia-Pascual A., Costa G., Labadia A., Jimenez A., Jimenez E., Triquero D. (1999), *Different mechanisms of urethral smooth muscle relaxation by several NO donors and nitric oxide*. Arch. Pharmacol., 360, 80–91.
- [67] Naganuma T., Miyakoshi M., Murayama T., Nomura X. (1998), *Regulation of noradrenaline release by S-nitrosocysteine inhibition in PC 12 cells in a cyclic GMP independent manner*. Eur. J. Pharmacol., 362, 277–283.
- [68] Göcmen C., Secilmis A., Ucar P., Karatas Y., Onder S., Dikmen A., Bayasal F. (1998), *A possible role of S-nitrosothiols at the nitrergic relaxations in the mouse corpus cavernosum*. Eur. J. Pharmacol., 361, 85–92.
- [69] Bindy R.E., Marczin N., Chester A.H., Jacoub M. (2000), *A redox-based mechanism for nitric oxide-induced inhibition of DNA synthesis in human vascular smooth muscle cells*. Br. J. Pharmacol., 129, (7), 1513–1521.
- [70] Naito Y., Yoshikawa T., Bobu Y., Fujii T., Masui Y., Tanaka Y., Yoshida N., Kondo M. (2000), *Protective role of intracellular glutathione against nitric oxide-induced necrosis in rat gastric mucosal cells*. Alimen. Pharmacol. Ther., 1, 145–152.
- [71] Cuzzocrea S., Zingarelli B., O'Connor M., Salzman A.L., Szabo C. (1998), *Effect of buthionine-(S,R)-sulphoximine an inhibitor of gamma-glutamylcysteine synthetase on peroxynitrite and endotoxic shock-induced vascular failure*. Br. J. Pharmacol., 123, 525–537.
- [72] Brzezińska A., Balińska M. (2000), *Rola homocysteiny w procesie rozwoju zmian miażdżycowych na poziomie komórkowym*. Post. Biol. Komórki, 27, 81–96.
- [73] Stamler J.S., Osborne J.A., Jaraki O., Rabbani L.E., Mullins M., Singel D., Loscalzo J. (1993), *Adverse vascular effects of homocysteine are modulative by endothelium-derived relaxing factor and related oxide of nitrogen*. J. Clin. Invest., 91, 308–318.
- [74] D'Emilia D.M., Lipton S.A. (1999), *Ratio of S-nitrosohomocysteine or other thiols determines neurotoxicity in rat cerebrocortical cultures*. Neurosci. Lett., 265, 103–106.
- [75] Bundy R.E., Marczin N., Chester A.H., Yacoub M. (2000), *A redox-based mechanism for nitric oxide-induced inhibition DNA synthesis in human vascular smooth muscle cells*. Br. J. Pharmacol., 129, 1513–1521.
- [76] Birnboim H.C., Privora H. (2000), *Depletion of intracellular glutathione reduces mutations by nitric oxide-donating drugs*. Nitric Oxide: Biology and Chemistry, 4, 496–504.
- [77] Maxwell S., Megson J., Webb D. (1999), *S-nitrosothiols for nitrate tolerance*. Lancet, 354, 338–339.
- [78] Inbal A., Gurevitz O., Tamarin J. et al. (1999), *Unique antiplatelet effects of a novel S-nitrosoderivative of a recombinant fragment of von Willebrandt factor AR 545C: In vitro and in vivo inhibition of platelet function*. Blood, 94, 1693–1700.
- [79] Venturini G., Colasanti M., Salvati L., Gradoni L., Asceni P. (2000), *Nitric oxide inhibits falcipain, the plasmodium falciparum trophozoile cysteine protease*. Biochem. Biophys. Res. Comm., 267, (1), 190–193.
- [80] Petit C., Bernardes-Genisson V., Hoffmann P., Souchard J., Labidalle S. (1999), *Novel donors of nitric oxide derived of S-nitrosocysteine possessing antioxidant activities*. Braz. J. Med. Biol. Res., 32, 1407–1412.
- [81] Cisowski J. (2001), *Wpływ stanu redoks komórki na aktywację czynników transkrypcyjnych i ekspresję genów*. Post. Biol. Komórki, 28, 43–59.
- [82] Thannickal V.J., Fanburg B.L. (2000), *Reactive oxygen species in cell signaling*. Am. J. Physiol., 276, L1005–L1028.

- [83] Metodiewa D., Koška C. (2000), *Reactive oxygen species and reactive nitrogen species: relevance to cyto(neuro)toxic events and neurologic disorders. An overview*. Neurotoxicity Res., 1, 197–233.
- [84] Schinnyashiki M., Chiang K.T., Switzer C.H., Gralla E.B., Valentine J.S., Thiele D.J., Fukuto J.M. (2000), *The interaction of nitric oxide (NO) with yeast transcription factor. A cell: A model system for NO-protection thiol interactions with implication to metal metabolism*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 2491–2496.
- [85] Guo Z., Miranda N., Wang P.G. (1999), *Protein S-nitrosating agents*. Methods Enzymol., 301, 249–254.
- [86] Lorch S.A., Foust R., Gow A., Arkovitz M., Salzman A.L., Szabo C., Vayert B., Gefford M., Ischiropoulos H. (2000), *Immunohistochemical localization of protein 3-nitrotyrosine and S-nitrosocysteine in murine model of inhaled nitric oxide therapy*. Pediatric Res., 47, 798–805.
- [87] Gladwin M.T., Ognibene F.P., Pannell L.K., Nichols J.S., Pease-Fye M.E., Shelhamer J.H., Schlechter A.N. (2000), *Relative role of heme nitrosylation and beta-cysteine 93 nitrosylation in the transport and metabolism of nitric oxide by hemoglobin in the human circulation*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 9943–9948.
- [88] Strand O.A., Leone A., Giercksky K.E., Kirkeboen K.A. (2000), *Nitric oxide indices in human septic shock*. Crit. Care. Med., 28, 2779–2785.
- [89] Sokolowska M., Wlodek L. (2001), *Dobre i zle strony tlenku azotu*. Folia Cardiol., 8, 467–477.
- [90] Chazotte-Aubert L., Hainaut P., Ohshima H. (2000), *Nitric oxide nitrates tyrosine residues of tumor-suppressor p53 protein in MCF-7 cells*. Biochem. Biophys. Res. Comm., 267, 609–613.
- [91] Ji Y., Akerboom T.P.M., Sies H., Thomas J.A. (1999), *S-nitrosylation and S-glutathiolation of protein sulfhydryls by S-nitrosoglutathione*. Arch. Biochem. Biophys., 362, 67–78.
- [92] Xian M., Chen X., Liu Z., Wang K., Wang P.G. (2000), *Inhibition of papain by S-nitrosothiols. Formation of mixed disulfides*. J. Biol. Chem., 275 (27), 20407–20473.
- [93] Xu L., Eu J.P., Meissner G., Stamler J.S. (1998), *Activation of cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation*. Science, 279, 234–236.
- [94] Kelm M., Schrader J. (1990), *Control of coronary vascular tone by nitric oxide*. Circul. Res., 66, 1561–1575.
- [95] Stamler J.S., Simon D.J., Osborne J.A., Mullins M.E., Jaraki O., Mitchel T. et al. (1992), *S-nitrosylation of protein with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 444–448.
- [96] Wang K., Zhang W., Xian M., Hou Y.C., Chen C., Ceng J.P. (2000), *New chemical and biological aspects of S-nitrosothiols*. Curr. Med. Chem., 7, 821–834.
- [97] Catani M.V., Bernassola F., Rossi A., Melino G. (1998), *Inhibition of clotting factor XIII activity by nitric oxide*. Biochem. Biophys. Res. Comm., 249, 275–278.
- [98] Stamler J.S., Toone E.J., Lipton S.A., Sucher N.J. (1997), *NO signals: translocation, regulation and a consensus motif*. Neuron, 18, 691–696.
- [99] Gow A.J., Stamler J.S. (1998), *Reactions between nitric oxide and hemoglobin under physiological conditions*. Nature, 301, 169–173.
- [100] Jia L., Bonaventura C., Stamler J.S. (1996), *S-nitrosohemoglobin: A dynamic activity of blood involved in vascular control*. Nature, 380, 221–226.
- [101] Pawłowski J.S., Swaminathan R.V., Stamler J.S. (1998), *Cell-free and erythrocytic S-nitrosohemoglobin inhibits human platelet aggregation*. Circulation, 97, 263–267.
- [102] Padron J., Peiro C., Cercas E., Llergo J.L., Sanchez-Ferrer C.F. (2000), *Enhancement of S-nitrosylation in glycosylated hemoglobin*. Biochem. Biophys. Res. Comm., 211, 217–221.
- [103] Bonaventura C., Ferruzzi G., Tesh S., Stevens R.D. (1999), *Effects of S-nitrosation oxygen binding by normal and sickle cell hemoglobine*. J. Biol. Chem., 274, 24742–24748.
- [104] Lander H.M., Jacovina A.T., Davis R.J., Tauras J.M. (1996), *Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species*. J. Biol. Chem., 271, 19705–19709.

- [105] della Torre A., Schroeder R.A., Barlett S.T., Kuo P.C. (1998), *Differential effects of nitric oxide-mediated S-nitrosylation on p50 and c-jun binding*. *Surgery*, 124, 137–147.
- [106] Mihn S., Ennen J., Pessara U., Kurth R., Dröge W. (1991), *Inhibition of HIV-1 replication and NF κ B activity by cysteine and cysteine derivatives*. *AIDS*, 5, 497–503.
- [107] Rupperecht H.D., Akagi Y., Keil A., Hofer G. (2000), *Nitric oxide inhibits growth of glomerular mesangial cells: Role of the transcription factor EGR-1*. *Kidney International*, 57, 70–82.
- [108] Choi Y.B., Tenneti L., Le D.A., Ortiz J., Bai G., Chen H.S., Lipton S.A. (2000), *Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation*. *Nature Neurosci.*, 3, 15–21.
- [109] Lang R.J., Harvey J.R., McPhee G.J., Klemm M.F. (2000), *Nitric oxide and thiol reagent modulation of Ca²⁺ activated K⁺ channels in myocytes of the Guinea pig taeniocardi*. *J. Physiol.*, 525, 363–376.
- [110] Li Z., Chapleau M.W., Bates J.N., Bielefeldt K., Lee H.C., Abboud F.M. (1998), *Nitric oxide as an autocrine regulator of sodium currents in baroreceptor neurons*. *Neuron*, 20, 1039–1049.
- [111] Broillet M.C., Firestein S. (1996), *Direct activation on the olfactory cyclic nucleotide-gated channel through modification of sulfhydryl groups by NO compounds*. *Neuron*, 15, 377–385.
- [112] Broillet M.C. (2000), *A single intracellular cysteine residue is responsible for the activation of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel by NO*. *J. Biol. Chem.*, 275, 15135–15141.
- [113] Kaye D.M., Gruskin S., Smith A.J., Estler M.D. (2000), *Nitric oxide mediated modulation of norepinephrine transport: identification of a potential target for S-nitrosylation*. *Br. J. Pharmacol.*, 130, 1060–1064.
- [114] Li X., Rose G., Dongre N., Pan H., Tobin J.R., Eisenach J.C. (2000), *S-nitroso-L-cysteine releases norepinephrine in rat spinal synaptosomes*. *Brain Res.*, 872, 301–307.
- [115] Hori K., Burd P.R., Furuoka K., Kutza J., Weih K.A., Clouse K.A. (1999), *Human immunodeficiency virus-1-infected macrophages inducible nitric oxide synthase and nitric oxide (NO) production in astrocytes: astrocytic NO as a possible mediator of neural damage in acquired immunodeficiency syndrome*. *Blood*, 93, 1843–1850.
- [116] Mannick J.B., Stamler J.S., Tseng E., Simpson N., Lawrence J., Jordan J., Finberg R.W. (1999), *Nitric oxide modulates HIV-1-replication*. *AADE*. Ed. J., 22, issue 1P, 1–9.
- [117] Persichini T., Colasanti M., Lauro G.M., Ascenzi P. (1998), *Cysteine nitrosylation inactivates the HIV-1 protease*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 250, 575–576.
- [118] Gobert A.P., Sembala S., Daulonede S., Lesthelle S., Taxile M., Veyret B. et al. (1998), *Murine macrophages use oxygen- and nitric oxide-dependent mechanisms to synthesize S-nitrosoalbumin and to kill extracellular trypanosomes*. *Infect. Immun.*, 66, 4068–4072.
- [119] Eu J.P., Liu L., Zeng M., Stamler J.S. (2000), *An apoptotic model for nitrosative stress*. *Biochemistry*, 39, 1040–1047.
- [120] Brune B., von Knethen A., Sandau K. (1998), *Nitric oxide and its role in apoptosis*. *Eur. J. Pharmacol.*, 351, 261–272.
- [121] Palluy O., Rigaud M. (1996), *Nitric oxide induces cultured cortical neuron apoptosis*. *Neurosci. Lett.*, 208, 1–4.
- [122] Rössig L., Fichtlscherer B., Breitschopf K., Haendeler J., Zeiher A.M., Mülsch A., Dimmeler S. (1999), *Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosylation in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 274, 6823–6824.
- [123] Kim Y.M., Chung H.Y., Kim S.S., Han J.A., Yoo Y.M., Kim K.M., Lee G.H., Yun H.Y., Green A., Li J., Simmons R.L., Biliar T.R. (1999), *Nitric oxide protects PC12 cells from serum deprivation apoptosis by cGMP-dependent inhibition of caspase signaling*. *J. Neurosci.*, 19, 6740–6747.
- [124] Beltran B., Orsi A., Clementi E., Moncada S. (2000), *Oxidative stress and S-nitrosylation of proteins in cells*. *Br. J. Pharmacol.*, 129, 953–960.

- [125] Miyamoto Y., Akaike T., Alam M.S., Inoue K., Hamamoto T., Ikebe N., Yoshiake J., Okamoto T., Maeda H. (2000). *Novel functions of human α_1 -protease inhibitor after S-nitrosylation: inhibition of cysteine protease and antibacterial activity*. Biochem. Biophys. Res. Comm., 267, 918–923.
- [126] Butzer V., Weidenbach H., Gonsauge S., Gonsauge F., Beger H.G., Nussler A.K. (1999). *Increased oxidative stress in the RAW 264.7 macrophage cell line is partially mediated via the S-nitrosothiol-induced inhibition of glutathione-reductase*. FEBS Lett., 445, 274–278.
- [127] Becker K., Ming G.U.J., Schirmer R.H. (1995). *Inhibition of human glutathione reductase by S-nitrosothiol*. Eur. J. Biochem., 234, 472–478.
- [128] Harbrecht B.G., Di Silvio M., Chough V., Kim Y.M., Simmons R.L., Bihari T.R. (1997). *Glutathione regulates nitric oxide synthase in cultured hepatocytes*. Annals of Surg., 225, 76–87.
- [129] Hofmann H., Schmidt H.W. (1995). *Thiol dependence of nitric oxide synthase*. Biochemistry, 34, 13443–13452.
- [130] Levenon A.L., Laakso J., Vaskonen T., Mervaala E., Karppanen H., Lapatto R. (2000). *Down-regulation of renal glutathione synthesis by systemic nitric oxide synthesis inhibition in spontaneously hypertensive rats*. Biochem. Pharmacol., 59, 441–443.
- [131] Avila M.A., Mingorance J., Martinez-Chantar M.L., Casado M., Martin-Sanz P., Bosca L., Mato J.M. (1997). *Regulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase during septic shock: Role of nitric oxide*. Hepatology, 25, 391–396.
- [132] Mato J.M., Alvarez L., Corrales F.J., Pajares M.A. (1994). *S-Adenosyl methionine and the liver*. W: *The Liver*. Eds. Arias J., Boyer J.L., Fausto N., Jakoby W.B., Schachler D., Schafritz D.A., Raven, New York, 461–470.
- [133] Gergel D., Cederbaum A.J. (1996). *Inhibition of the catalytic activity of alcohol dehydrogenase by nitric oxide is associated with S-nitrosylation and the release of zinc*. Biochemistry, 35, 16186–16194.
- [134] Xian M., Wang K., Chen X., Hou Y., McGill A., Zhou B., Zhang Z.Y., Cheng J.P., Wang P.G. (2000). *Inhibition of protein tyrosine phosphatases by low molecular weight S-nitrosothiols and S-nitrosylated human serum albumine*. Biochem. Biophys. Res. Comm., 268, 310–314.
- [135] Mohr S., Stamler J.S., Brüne B. (1994). *Mechanism of covalent modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at its active site thiol by nitric oxide, peroxynitrite and related nitrosating agents*. FEBS Lett., 348, 223–227.
- [136] Nakazawa M., Uehara T., Nomura Y. (1997). *Koningic acid (a potent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibitor) induced fragmentation and condensation of DNA in NG108-15 cells*. J. Neurochem., 68, 2493–2499.
- [137] Dimmeler S., Brüne B. (1992). *Characterization of nitric oxide catalyzed ADP-ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. Eur. J. Biochem., 210, 305–310.
- [138] Brune B., Dimmeler S., Moling Y., Vadina L., Lapetina E.G. (1993). *Nitric oxide: A signal for ADP ribosylation of proteins*. Life Sci., 54, 61–70.
- [139] Galli F., Rovidati S., Ghibelli L., Canestrari F. (1998). *S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase decreases the enzyme affinity to the erythrocyte membrane*. Nitric Oxide, 2, 17–27.
- [140] Mohr S., Stamler J.S., Brüne B. (1996). *Posttranslational modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by S-nitrosylation and subsequent NADH attachment*. J. Biol. Chem., 271, 4209–4214.
- [141] Ishii T., Sunami O., Nakajima H., Nishio H., Takeuchi T., Hata T. (1999). *Critical role of sulfenic acid formation of thiols in inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by nitric oxide*. Biochem. Pharmacol., 58, 133–145.
- [142] Marsh N., Marsh A. (2000). *A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology*. Clin. Exper. Pharm. Physiol., 27, 313–319.

- [143] Bennet B.M., McDonald B.J., Nigam R., Simon W.C. (1994), *Biotransformation of organic nitrates and vascular smooth muscle cell function*. TIPS, 15, 245–249.
- [144] Sellke F.W., Tomanek R.J., Harrison D.G. (1991), *L-cysteine selectively potentiates nitroglycerin-induced dilation of small coronary microvessels*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 258, 365–369.
- [145] Gruetter C.A., Lemke S.M. (1986), *Effects of sulfhydryl reagents on nitroglycerin – induced relaxation of bovine coronary artery*. Can. J. Physiol. Pharmacol., 64, 1395–1401.
- [146] Chong S., Fung H.L. (1991), *Biochemical and Pharmacological interaction between nitroglycerin and thiols*. Biochem. Pharmacol., 42, 1433–1439.
- [147] Ignarro L.J., Lipton H., Edwards J.C., Baricos W.H., Hyman A.L., Kadowitz P.J., Gruetter C.A. (1981), *Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates i nitrites, nitroprusside and nitric oxide: Evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 218, 739–749.
- [148] Nigam R., Anderson D.J., Lee S.F., Bennet B.M. (1996), *Isoform specific biotransformation of glyceryl trinitrate by rat aortic glutathione S-transferase*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 297, 1527–1534.
- [149] Yeates R.A., Schmidt M., Leitold M. (1989), *Antagonism of glyceryl trinitrates activity by an inhibitor of glutathione-S-transferase*. Biochem. Pharmacol., 38, 1749–1753.
- [150] Schröder H. (1992), *Cytochrome P₄₅₀ mediates bioactivation of organic nitrates*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 262, 298–302.
- [151] Chung S.J., Fung H.L. (1990), *Identification of the subcellular site for nitroglycerin metabolism to nitric oxide in bovine coronary smooth muscle cells*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 253, 614–619.
- [152] Seth P., Fung H.L. (1993), *Biochemical characterization of membrane-bound enzyme responsible for generating nitric oxide from nitroglycerin in vascular smooth muscle cells*. Biochem. Pharmacol., 46, 1481–1486.
- [153] Boesgaard S., Poulsen H.E., Aldershvile J., Loft S., Anderson M.E., Meister A. (1993), *Acute effects of nitroglycerin depend on both plasma and intracellular sulfhydryl compounds levels in vivo. Effect of agents with different sulfhydryl modulating properties*. Circulation, 87, 550–553.
- [154] Robak J., Gryglewski R.J. (1995), *In vitro generation and decomposition of S-nitrosothiols from direct and indirect nitric oxide donors*. Pol. J. Pharmacol., 47, 63–67.
- [155] Hill K.E., Hunt R.W., Jones R., Hoover R.L., Burk R.F. (1992), *Metabolism of nitroglycerin by smooth muscle cells. Involvement of glutathione and glutathione S-transferase*. Biochem. Pharmacol., 43, 561–566.
- [156] Tseng C.M., Tabrizi-Ford M.A., Fung H.L. (2000), *Differential sensitivity among nitric oxide donors towards ODO-mediated inhibition of vascular relaxation*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 292, 737–748.
- [157] Boesgaard S. (1995), *Thiol compounds and organic nitrates*. Danish Med. Bull., 42, 473–484.
- [158] Axelsson K.L., Ahlner J. (1987), *Nitrate tolerance from a biochemical point of view*. Drugs, 33, (suppl. 4), 63–68.
- [159] Vasiri N.D., Wang V.X., Oveisi F., Rad B. (2000), *Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats*. Hypertension, 36, 142–146.
- [160] Münzel T., Sayegh H., Freeman B.A., Tarpey M.M., Harrison D.G. (1995), *Evidence for an enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance: A novel mechanism underlying of tolerance and cross-tolerance*. J. Clin. Invest., 95, 187–194.
- [161] Grosser N., Schröder H. (2000), *A common pathway for nitric oxide release from NO-aspirin and glyceryl trinitrate*. Biochem. Biophys. Res. Comm., 274, 255–258.
- [162] Ratz J.D., McGuire J.J., Anderson D.J., Bennet B.M. (2000), *Effects of the flavoprotein inhibitor, diphenyleneidonium sulfate on in vivo organic nitrate tolerance in the rat*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 293, 569–577.

- [163] Needleman P., Jakschik B., Johnson E.M. (1973), *Sulfhydryl requirement for relaxation of vascular smooth muscle*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 187, 324–331.
- [164] Boesgaard S., Aldershvile J., Poulsen H.E. (1992), *Preventive administration of intravenous N-acetylcysteine and development of tolerance to isosorbic dinitrate in patients with angina pectoris*. Circulation, 85, 143–149.
- [165] Boesgaard S., Petersen J.S., Aldershvile J., Poulsen H.E., Flachs H. (1991), *Nitrate tolerance: Effect of thiol supplementation during prolonged nitroglycerin infusion in an in vivo rat model*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 258, 851–856.
- [166] Boesgaard S., Aldershvile J., Poulsen H.E., Loft S., Anderson M.E., Meister A. (1994), *Nitrate tolerance in vivo is not associated with depletion of arterial or venous thiol levels*. Circ. Res., 74, 115–120.
- [167] Williamson J.M., Meister A. (1981), *Stimulation of hepatic glutathione formation by administration of L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate, a 5-oxoprolinase substrate*. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 98, 936–939.
- [168] Dikalov S., Fink B., Skatchkov M., Stalleicken D., Bassenge E. (1998), *Formation of reaction oxygen species by pentaerithritrinitrate and glyceryl trinitrate in vitro and development of nitrate tolerance*. J. Pharm. Exp. Ther., 286, 938–944.
- [169] Kelm M., Dahmann R., Wink D., Feelisch M. (1997), *The nitric oxide/superoxide assay. Insights into the biological chemistry of the NO/O₂[•] interaction*. J. Biol. Chem., 272, 9922–9933.
- [170] Bassenge E., Fink N., Skatchow M., Fink B. (1998), *Dietary supplement vit. C prevents nitrate tolerance*. J. Clin. Invest., 102, 67–71.
- [171] Watanabe H., Kakihana M., Ohtsuka S., Sugishita Y. (1996), *The preventive effect of vitamin E on nitrate tolerance*. Circulation, 94S, I, 503–504.
- [172] Münzel T., Kurtz S., Rajagopalan S. et al. (1996), *Hydralazine prevents nitroglycerin tolerance by inhibiting activation of membrane bound NADH oxidase: a new action for an old drug*. J. Clin. Invest., 98, 1465–1470.
- [173] Rogalska J. (2000), *Tlenek azotu w patologii niedotlenienia: sojusznik i wróg*. Post. Hig. Med. Dośw., 54, 669–686.
- [174] Radi R., Beckman J.S., Bush K.M., Freeman B.A. (1991), *Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls*. J. Biol. Chem., 266, 4244–4250.
- [175] D-Ischia M., Palumb A., Buzzo E. (2000), *Interactions of nitric-oxide with lipid peroxidation products under aerobic conditions: Inhibitory effects on the formation of malondialdehyde and related thiobarbituric acid-reactive substances*. Nitric Oxide, 4, 4–14.
- [176] Schauenstein E., Esterbauer H. (1975), *Formation and properties of reactive aldehydes*. Submolecular Biology and Cancer, Ciba Foundation, Series 67, Excerpta Medica 225.
- [177] Patel R.P., Levenon A., Crawford J.H., Darley-Usmar V.M. (2000), *Mechanisms of the pro and anti-oxidant actions of nitric oxide in atherosclerosis*. Cardiovasc. Res., 47, 465–474.
- [178] Oates J.C., Christensen E.F., Reilly C.M., Self S.E., Glikeson G.S. (1999), *Prospective measure of serum 3-nitrotyrosine levels in systemic lupus Erythematosus. Correlation with disease activity*. Proc. Assoc. Amer. Phys., 111, 611–621.
- [179] Skatchkov M., Larino L., Larin A., Fink N., Bassenge E. (1997), *Urinary nitrotyrosine content as a marker of peroxynitrite-induced tolerance to organic nitrates*. J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther., 2, 85–86.
- [180] Cabassi A., Bouchard J.F., Dumont E.C., Girouard H., Le Jossec M., Lamontagne D., Besner J.G., Champlain J. (2000), *Effect of antioxidant treatments on nitrate tolerance development in normotensive and hypertensive rats*. J. Hypertension, 18, 187–196.
- [181] Vaziri N.D., Wana X.D., Oveisi F., Rod B. (2000), *Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats*. Hypertension, 30, 142–146.
- [182] Kawamura M., Heinecke J.W., Chait A. (1994), *Patophysiological concentration of glucose promote oxidative modification of low density lipoprotein by superoxide-dependent pathway*. J. Clin. Invest., 94, 771–778.

- [183] Lought D.W., Kengatharan K.M., Gapaul M.K., Anghard E.E., Carrier M.J. (1998), *Investigation of oxidant stress and vasodepression to glyceryl trinitrate in the obese Zucker rat in vivo*. Br. J. Pharmacol., 125, 895–901.
- [184] Giugliano D., Martella R. (1998), *Antioxidants and nitrate tolerance*. Circulation, 98, 1350–1351.
- [185] Braugher J.M. (1983), *Soluble guanylate cyclase activation by nitric oxide and its reversal involvement of sulfhydryl group oxidation and reduction*. Biochem. Pharmacol., 32, 811–818.
- [186] Boesgaard S., Iversen H., Wróblewski H., Poulsen H.E., Frandsen H., Kastrup J., Aldershvile J. (1994), *Altered peripheral vasodilatory profile of nitroglycerin during long-term infusion of N-acetylcysteine*. J. Am. Coll. Cardiol., 23, 163–169.
- [187] Meister A. (1989), *On the biochemistry of glutathione*. W: *Glutathione Centennial*. Eds. Taniuchi N., Meister A., Orlando/New York, Academic Press, Inc.
- [188] Kurz S., Hink U., Nickening G., Borthayre A.B., Harrison D.G., Münzel T. (1999), *Evidence for causal role of the renin-angiotensin system in nitrate tolerance*. Circulation, 99, 3181–3187.
- [189] Boesgaard S., Aldershvile J., Poulsen H.E., Christensen S., Dige-Peterson H., Giese J. (1993), *N-acetylcysteine inhibits angiotensin converting enzyme in vivo*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 265, 1239–1244.
- [190] Glasser S.P. (1999), *Prospects for therapy of intake tolerance*. Lancet, 353, 1545–1546.
- [191] Megson I.L., Greig J.R., Gray G.A., Webb D.J., Butler A.R. (1999), *S-nitrosothiols are nitric oxide donor drugs that do not engender vascular tolerance and remain effective in glyceryl trinitrate-tolerant rat femoral arteries*. Br. J. Pharmacol., 126, 78P (abstract).
- [192] Planinc D., Majsec M. (1999), *How long can an escalation of dose override tolerance to the hypotensive efficacy of nitroglycerin infusion in coronary care patients*. Cardiovasc. Drugs Ther., 13, 531–536.
- [193] Persson K., Andersson R.G.G. (1999), *Nitric oxide modulates captopril-mediated angiotensin-converting enzyme inhibition in porcine iliac arteries*. Eur. J. Pharmacol., 385, 21–27.
- [194] May J.M. (2000), *How does ascorbic acid prevent endothelial dysfunction?* Free Radic. Biol. Med., 28, 1421–1429.
- [195] Alon-Mohamed G., Kaesemeyer W.H., Caldwell R.B., Caldwell R.W. (2000), *Role of arginine in the vascular actions and development of tolerance to nitroglycerin*. Br. J. Pharmacol., 130, 209–210.
- [196] Konukoglu D., Serin O., Yelke H.K. (2000), *Effects of hormone replacement therapy on plasma nitric oxide and total thiol levels in postmenopausal women*. J. Toxicol. Environ. Health, 60, 81–87.
- [197] Jia L., Young X., Guo W. (1999), *Physicochemistry, pharmacokinetics and pharmacodynamics of S-nitrosocaptopril crystals, a new nitric oxide donor*. J. Pharmac. Sc., 88, 981–986.